UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Análisis de la variabilidad genética de 14 virus de influenza porcina circulantes en explotaciones comerciales de las regiones de mayor productividad en Colombia durante el periodo de 2008 a 2013

Lady Carolina González Carmona

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Posgrados Interfacultades
Bogotá, Colombia
2015

Análisis de la variabilidad genética de 14 virus de influenza porcina circulantes en explotaciones comerciales de las regiones de mayor productividad en Colombia durante el periodo de 2008 a 2013

Lady Carolina González Carmona

Código. 2635150

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Magister en Ciencias Microbiología

Director (a):
MV. MSc. PhD. Gloria Consuelo Ramírez Nieto

Línea de Investigación:

Biología molecular para la detección de agentes infecciosos

Grupo de Investigación: Microbiología y Epidemiología Veterinaria

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Posgrados Interfacultades
Bogotá, Colombia
2015

A mis padres, quienes me han apoyado con su amor y compresión

en cada instante de mi vida.

A Filomena, Ramón y Gary

A mis amigos

Agradecimientos

A mis padres por el apoyo y comprensión durante todas y en especial esta etapa de mi vida, por brindarme las herramientas necesarias para mi formación espiritual y profesional, por contar siempre con ustedes para afrontar todos los obstáculos sin importar cual grandes y difíciles parezcan.

A Filomena y Ramón por acompañarme en todo este proceso con su dulzura y a Gary por quien empecé este proceso.

A Milena Sánchez, por escucharme y mantenerme enfocada.

A Socorro Prieto y la Dra. Martha Fontanilla por su incondicional y necesaria colaboración

A la Dra. Gloria Ramírez Nieto por todo su apoyo y su orientación en mi formación académica.

Gracias al Dr. Víctor Vera y al Dr. Jairo Jaime por permitirme ser parte del grupo de virología especial y a Yaneth Gómez por su colaboración en la preparación del material de laboratorio

A mis compañeros de laboratorio Adri, Alejo, Dianis, Susi y Luchita quienes estuvieron apoyándome durante este trabajo y me regalaron muchos momentos memorables.

A Jane Gamba por su colaboración para la culminación de este tesis

Resumen

La influenza porcina es una enfermedad respiratoria aguda ocasionada por un virus del género influenza tipo A, afectando diferentes especies de aves y mamíferos incluidos el humano. En cerdos, la influenza se asociada al complejo de enfermedades respiratorias porcinas (CERP), el cual afecta principalmente a cerdos en crecimiento y finalización, y se caracteriza por producir un crecimiento lento de los animales, disminución en la eficiencia alimenticia letargia, anorexia, fiebre y tos. Desde el punto de vista de salud pública, la influenza porcina plantea problemas debido a que el cerdo juega un papel importante como mediador en la transmisión inter-especie del virus y en la generación de nuevos subtipos virales.

En Colombia, la infección por el virus de influenza en cerdos ha sido detectada desde hace más de cuarenta años y recientemente se han aislado cepas de virus de influenza del tipo H1N1, lo que plantea la necesidad de caracterizar molecularmente a los virus circulantes en el país para detectar mutaciones potencialmente implicadas con el aumento de la virulencia de las cepas, posibles cambios asociados a la resistencia antiviral y a las variaciones antigénicas que permiten la evasión del sistema inmune del huésped. Con el fin de profundizar en estos temas, se realizó el análisis de la variabilidad de los virus de influenza porcina aislados y reportados en Colombia provenientes de las regiones de mayor productividad porcícola entre los años 2008 a 2013, determinando los cambios en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de los genes HA y NA, de importancia evolutiva para el virus, además del análisis filogenético del gen de la neuraminidasa (NA) y Hemaglutinina (HA) de estos agentes, para establecer relaciones evolutivas con virus de influenza porcina reportados a nivel mundial. La mayoría de los cambios encontrados en las secuencias de nucleótidos para el gen HA y NA, correspondieron a mutaciones sinónimas que no produjeron cambios en la secuencia de la proteína, y los cambios que fueron asociados con mutaciones no sinónimas, no han sido reportados en la literatura como causantes de cambio en la antigenicidad de las proteínas. Con respecto a los posiciones en las secuencias de HA y NA, que representan importancia evolutiva, estas se relacionaron principalmente con diferencias encontradas a nivel de afinidad y avidez por la unión a los receptores de ácido siálico de las células huésped para el gen HA, para el gen NA, las posiciones que determinan resistencia

hacia antivirales no fueron identificadas para ninguno de los virus de influenza porcina Colombianos. Además, los análisis filogenéticos permitieron establecer las relaciones a nivel del gen HA y NA de los virus de influenza porcina Colombianos con respecto a cepas reportadas mundialmente de los virus de subtipo H1N1 clásicos y pandémicos, evidenciando relaciones cercanas con cepas Americanas y Asiáticas tanto para los virus clásicos como para los virus pandémicos colombianos analizados.

Estos hallazgos contribuyen a nuestra comprensión del curso de la evolución genética y antigénica de los virus de Influenza porcina circulantes en las poblaciones de cerdos de Colombia, y en consecuencia, contribuyen al estudio y selección de posibles métodos de control contra este agente infeccioso.

Palabras claves: Virus de Influenza Porcina, variabilidad genética, Hemaglutinina, Neuraminidasa, Colombia

Abstract

Swine influenza is a respiratory disease caused by influenza virus type A, which affects different species of birds and mammals including humans. SIV is associated to the porcine respiratory and reproductive syndrome in pigs, a disease complex causing stunting, a decrease in feed intake, lethargy, anorexia, fever and cough. Swine influenza virus is a major concern from the public health point of view, due to the fact that the pig has a major role as an intermediate host that contributes to the genesis of new viruses with pandemic potential.

In Colombia, influenza virus infection in pigs has been present for over forty years, but only until recently there was viral isolation of field strains. The fact that classic and pandemic swine influenza viruses of the H1N1 subtype were isolated from the main swine producing regions of the country demonstrates that there is a need to know the molecular characteristics of these viruses in order to establish if they suffered changes that could be related to increased virulence, antiviral resistance or antigenic changes that can evade the host immune response .

In order to achieve this goal, an analysis of the variability at the nucleotide and amino acid level of the sequence of the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes of swine influenza viruses reported in Colombia between 2008-2013, was performed. The study looked for changes of evolutionary significance, and phylogenetic trees were constructed accordingly to establish evolutionary relationships with swine influenza virus reported worldwide.

Most of the changes found at the nucleotide sequences for the HA and NA genes, corresponded to synonymous mutations that did not result in changes at the protein level, and the changes that were associated with non-synonymous mutations, have not yet been reported in the literature as a cause of change in the antigenicity of these proteins. The positions in the sequences of HA and NA with evolutionary significance were related to differences associated with the affinity and avidity for the recognition of different conformation of sialic acid receptors in the host cells., Changes at the positions related to antivirals resistance were not identified in any of the Colombian swine flu viruses of this study.

The phylogenetic analysis of the HA and NA genes of the classic and pandemic Colombian H1N1 swine influenza viruses showed that these were closely related to American and Asian strains.

These findings contribute to our understanding of the course of genetic and antigenic evolution of influenza viruses circulating in pig populations of Colombia, and therefore provide insights in the development of control strategies against this infectious agent.

Key words: Swine Influenza Virus, genetic variability, Hemagglutinin, Neuraminidase, Colombia

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XV**

Lista de tablas ..... **XVII**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XVIII**

Introducción **1**

1. Marco teórico **5**
1.1 El virus de Influenza 5
1.1.1 Generalidades del virus de Influenza 5
1.1.1.1 Complejo Polimerasa 10
1.1.1.2 Hemaglutinina 11
1.1.1.3 Nucleoproteína 14
1.1.1.4 Neuraminidasa 14
1.1.1.5 Matriz 16
1.1.1.6 Proteínas no Estructurales 17
1.1.2 Replicación del virus de Influenza 18
1.1.3. Variaciones Antigénicas 21
1.1.3.1 Deriva antigénica (*Antigenic drift*) 22
1.1.3.2 Cambio o Salto antigénico (*Antigenic shift*) 22
1.1.4 Evolución de los virus de influenza A 23
1.2. Influenza Porcina 27
1.2.1 Generalidades de la Influenza Porcina 27
1.2.2 Transmisión, Factores de Riesgo y Potencial Zoonótico del Virus de Influenza Porcina 29
1.2.3 Signos Clínicos 31
1.2.4 Evolución del Virus de Influenza Porcina y su relación con la presentación de pandemias 32
1.2.5 Influenza Porcina en América central, Suramérica y Colombia 38

2. Materiales y métodos **41**
2.1 Objetivo 1. Obtener la información sobre las secuencias de los virus de influenza porcina reportados en Colombia de 2008 a 2013 y comparar dichas secuencias a nivel de nucleótidos 41
2.1.1 Aislamientos virales 41
2.1.2 Bases de Datos 44

2.1.3 Fluidos Orales 45
2.1.4 Extracción de ARN Viral 45
2.1.5. Síntesis de cADN 46
2.1.6 Estrategia para la amplificación del gen de la Hemaglutinina (HA) y de Neuraminidasa (NA) 46
2.1.7 PCR convencional para la amplificación de los genes HA y NA 48
2.1.8 Purificación y Secuenciación 49
2.2 Objetivo 2. Determinar los posibles cambios en las secuencias de los genes HA y NA de los virus de influenza porcina que tengan relevancia evolutiva basada en la literatura científica 51
2.2.1 Cambios en las Secuencias de las Glicoproteínas 51
2.3 Objetivo 3. Establecer las relaciones filogenéticas de los virus de influenza porcina reportados en Colombia con la información encontrada en el Genbank y con los virus porcinos reportados en otras partes del mundo 52
2.3.1 Análisis Filogenético 52

3. Resultados y discusión 53
3.1 Objetivo 1. Obtener la información sobre las secuencias de los virus de influenza porcina reportados en Colombia entre los años 2008 a 2013 y comparar dichas secuencias a nivel de nucleótidos 53
3.1.1 Aislamientos virales 53
3.1.2 Bases de Datos 57
3.1.3 Fluidos Orales 57
3.1.4 Identificación de los cambios en la secuencia de los genes de HA y NA de los virus de influenza porcina Colombianos 58

4. Conclusiones 95

5. Perspectivas 99

Anexos: 101

Bibliografía 105

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1. Estructura del Virus de Influenza A 9
Figura 1-2 Ciclo de replicación del virus de Influenza A. 20
Figura 1-3. Esquema en el tiempo de las cepas de influenza A con importancia en eventos pandémicos. 25
Figura 1-4. Origen del virus de influenza A/H1N1 Pandémica 26
Figura 1-5. Reordenamiento genético del virus de influenza con referencia a virus de influenza humano y porcino. 33
Figura 1-6. Comportamiento serológico del virus de influenza en Colombia 40
Figura 3-1. Amplificación del gen HA primer fragmento. 54
Figura 3-2. Amplificación del gen HA segundo fragmento. 55
Figura 3-3. Amplificación del gen NA primer fragmento. 55
Figura 3-4. Amplificación del gen NA segundo fragmento. 56
Figura 3-5. Relaciones evolutivas del gen HA de los virus de influenza porcina 86
Figura 3-6. Relaciones evolutivas del gen NA de los virus de influenza porcina 90

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1 Composición del genoma del virus de Influenza A 6
Tabla 2-1 Aislamientos de SIV entre 2008 – 2010 43
Tabla 2-2 Muestras de influenza porcina correspondientes al 2011 disponibles en Influenza Research Database. 44
Tabla 2-3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen HA 47
Tabla 2-4. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen NA 48
Tabla 2-5. Oligonucleótidos empleados para la secuenciación del gen HA. 50
Tabla 2-6. Oligonucleótidos empleados para la secuenciación del gen NA. 50
Tabla 3-1. Cambios en los nucleótidos del gen HA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémico de los Llanos Orientales de Colombia que originan variaciones en la proteína. 59
Tabla 3-2. Mutaciones No sinónimas en la proteína del gen HA de los virus de Influenza Porcina de los Llanos Orientales de Colombia. 60
Tabla 3.3. Cambios en los aminoácidos del gen HA del virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémico A/Swine/Colombia/1503/2010. 61
Tabla 3.4. Cambios en los nucleótidos del gen HA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémico Colombianos que producen variaciones en la proteína. 62
Tabla 3.5. Cambios en los aminoácidos del gen HA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémico correspondiente al año 2009. 63
Tabla 3.6. Variaciones en el gen HA entre los virus de influenza Porcina H1N1 clásico Colombianos. 64
Tabla 3-7. Cambios en los aminoácidos del gen HA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 clásico correspondientes al año 2008. 66

Tabla 3-8. Cambios en los aminoácidos del gen NA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémicos Colombianos 67
Tabla 3-9. Cambios en la secuencia de nucleótidos del gen NA entre los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 clásico Colombiano. 70
Tabla 3-10. Cambios en la secuencia de aminoácidos del gen NA entre el virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 clásico Colombiano y la cepa de referencia. 70
Tabla 3-11. Posiciones en la proteína HA1 de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémico Colombianos de importancia evolutiva. 74
Tabla 3-12 Posiciones en la proteína HA1 de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 clásico Colombiano de importancia evolutiva. 75
Tabla 3-13. Posiciones en la proteína NA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémicos Colombianos de importancia evolutiva. 81
Tabla 3-14. Posiciones en la proteína NA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 clásicos Colombianos de importancia evolutiva. 81

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas	Término
α-2,3	Receptor de tipo alpha 2,3
α-2,6	Receptor de tipo alpha 2,6
λ	Marcador de peso lambda

Subíndices	Término
®	Marca registrada
MT	

Abreviaturas	Término
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PB1	Polimerasa Básica 1
PA	Polimerasa ácida
PB2	Polimerasa Básica 2
HA	Hemaglutinina
NA	Neuraminidasa
NP	Nucleoproteína
M1-M2	Proteína de matríz 1 – 2

NS1	Proteína NS
cDNA	Ácido desoxirribonucleico copia
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

MDCK	Células de Riñón Canino
H1N1p	H1N1 Pandémico
H1N1c	H1N1 Clásico
qPCR	PCR en Tiempo Real

Introducción

La infección por el virus de la influenza A es una causa frecuente de enfermedades respiratorias en todo el mundo. En los cerdos, dicha infección se encuentra asociada al complejo respiratorio porcino, ocasionando síntomas como fiebre, anorexia, letargo, estornudos, tos y disnea (Larsen*, et al.*, 2001). La enfermedad se caracteriza por presentar una alta morbilidad y mortalidad variable, la cual depende de la presencia de la infección con agentes concomitantes. El principal impacto en la industria porcina se debe a las consecuencias económicas ocasionadas por la infección reflejadas en las bajas tasas de ganancia de peso del animal y al aumento en los tiempos de salida al mercado, adicional a esto el virus de la influenza porcina es de gran relevancia debido a que representa un riesgo, desde el punto de vista de la salud pública, por su potencial como agente zoonótico debido a la posibilidad de transmisión interespecie en la cual el cerdo juega un papel relevante (Alexander y Brown, 2000; Richt, *et al*., 2003; Larsen, *et al.,* 2001; Ma, *et al*., 2009; Parmar, *et al*., 2011; Ramírez-Nieto, *et al.,* 2012).

Tradicionalmente se ha otorgado un papel protagónico al cerdo en la aparición de nuevos virus de influenza A, lo anterior basado en el hecho de que las células epiteliales del tracto respiratorio de los cerdos presentan receptores de superficie celular que son de preferencia no solo para los virus porcinos sino también para los virus de influenza aviar y humanos, posibilitando así la infección por varios subtipos del virus en una misma célula (Brown, 2000). Por lo anterior, se ha sugerido que los cerdos pueden actuar como

un recipiente de mezcla para la generación de nuevos subtipos del virus de influenza como resultado del reordenamiento genético por el shift antigénico, el cual consiste en la generación de una progenie viral con segmentos genómicos de dos o más virus que han infectado a la misma célula (Scholtissek, 1990; Ma, *et al*., 2009).

En los últimos años, la aparición de brotes de infección por el virus de influenza porcina se ha venido presentando a intervalos regulares en las granjas a nivel mundial, desafiando la capacidad protectora del sistema inmunológico de los cerdos (Combadière B et *al.,* 2010). Como resultado de esto, la vacunación se ha vuelto una práctica común como estrategia de control en la industria porcina de los Estados Unidos y Europa; sin embargo, el desarrollo de vacunas eficaces que generen inmunidad cruzada contra cepas heterólogas se ha convertido en un gran desafío por los rápidos cambios que los diferentes subtipos de los virus de Influenza porcina han sufrido a través del tiempo, debido a las recombinaciones y al drift antigénico (Platt R et al., 2011). Actualmente, las vacunas empleadas contra SIV en los Estados Unidos y en Europa son biológicos de tipo inactivado que están aprobadas o autorizadas para ser aplicadas en animales mayores a 3 semanas de edad y requieren de la aplicación de una segunda dosis (Kitikoon P et al., 2009).

En Colombia, se reconoce la existencia y circulación del virus de influenza en cerdos desde hace cerca de 40 años, basados principalmente en evidencia serológica, desconociendo sin embargo, las características biológicas y moleculares de los agentes virales que han estado circulando en el campo **(**Hanssen, *et al*., 1977; Moscoso y Neira, 2001; Mogollón, *et al.,* 2003; Cucaita, 2005; Jaime *et al.*, 2011). Sólo hasta el año 2012 se publican los primeros resultados del aislamiento de cepas de campo de virus de

influenza del tipo H1N1 clásico y pandémico, en cerdos provenientes de las tres áreas productivas más representativas de Colombia (Ramirez-Nieto *et al.,* 2012). Lo anterior demuestra la presencia de infección activa con el virus de influenza en las explotaciones comerciales de cerdos en el país resaltando la necesidad de conocer las características de los virus de influenza porcina que circulan en nuestro medio y el impacto que pudo tener en la ecología del virus de influenza del tipo H1N1 pandémico entre las poblaciones donde previamente circulaban virus del tipo H1N1 clásico y muy probablemente del tipo H3N2. Lo anterior toma más relevancia cuando analizamos la rápida aparición de nuevos virus de influenza porcina posterior al virus de influenza pandémica del tipo H1N1, de lo cual existe evidencia en Sur América, en particular en Argentina donde se reporta el hallazgo de dos eventos independientes de reordenamiento entre el virus de la influenza H1N1 pandémica y el virus de influenza porcina *human- like,* demostrando la constante evolución de los virus de influenza (Pereda, *et al.,* 2011).

Lo anterior resalta el riesgo potencial, desde el punto de vista de la salud pública y de la salud animal, que representa la circulación del virus de influenza A en poblaciones porcinas, por la capacidad de reordenarse y producir nuevas cepas capaces de infectar poblaciones susceptibles y demuestra la necesidad de llevar a cabo estudios que permitan conocer y caracterizar las cepas del virus de influenza presentes tanto en poblaciones animales como en el humano en nuestro país.

Es importante mencionar que en Colombia, no se vacuna contra los virus de Influenza porcina y el riesgo de establecer un plan de vacunación contra el virus en el país sin conocer realmente las características de las cepas que están interactuando en el medio y

que podrían eventualmente favorecer mutaciones de los virus como resultado de la presión inmunológica (Mancipe, 2012; San Juan, *et al.* 2005; De Visser, *et al.,* 2007).

1. Marco teórico

1.1 El virus de Influenza

1.1.1 Generalidades del virus de Influenza

El género influenza incluye los virus de influenza A, B y C, los cuales pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y se agrupan de acuerdo con diferencias antigénicas en sus nucleoproteínas (NP) y proteínas de matriz (M) (Widjaja, et al*.,* 2004). Dentro de estos, los virus de influenza A cobran mayor importancia debido el amplio rango de huéspedes susceptibles que cubre diferentes especies de mamíferos incluyendo al humano, porcinos, equinos y mamíferos marinos (Wu, *et al.,* 2014), así como a una amplia gama de aves domésticas y silvestres (Fouchier, *et al.,* 2003).

El genoma del virus de influenza A, es de tipo ARN en sentido negativo de cadena sencilla, cubierto (Ma *et al.,* 2009); dicho genoma tiene una longitud total de 13600 nucleótidos, y está compuesto por ocho segmentos génicos que codifican para por lo menos 12 proteínas funcionales (Tabla 1-1) (Wise *et al*., 2009; Jagger *et al*., 2012; Wu *et al.,* 2014). Los tres primeros segmentos que codifican para el complejo polimerasa del virus son PB1, PA y PB2 (Steinhauer y Skehel, 2002; Cheung y Poon, 2007; Jagger et al., 2012; Zamarin, *et al., 2005*); los segmentos cuatro y seis codifican para las glicoproteínas de superficie HA y NA, las cuales constituyen los mayores antígenos virales (Shi, *et al.,* 2014; Hensley, *et al., 2011*). El segmento cinco codifica para la Nucleoproteína (NP), la cual se une al RNA viral para formar el complejo ribonucleoproteína (Nelson y Holmes, 2007) y el segmento siete codifica para

dos proteínas, la proteína de matriz M1 que le da estructura a la cápside viral y la proteína de matriz M2 que funciona como un canal de iones, finalmente el segmento ocho codifica para las proteínas NS1 y NEP que manejan el transporte, transcripción y empalme del RNA (Steinhauer y Skehel, 2002; Bouvier y Palese, 2008). Para cada uno de los 8 segmentos, los 13 y 12 nucleótidos de los extremos 5´ y 3´, respectivamente, son altamente conservados entre todos los virus de influenza A (Lamb y Choppin, 1983, Arias *et al.,* 2009).

Tabla 1-1: Composición del genoma del virus de Influenza A

SEGMENTOS DE RNA DEL GENOMA DEL VIRUS DE INFLUENZA A					
NÚMERO DE SEGMENTO	**TAMAÑO DEL GEN (pb)**	**PROTEÍNA QUE CODIFICA**	**TAMAÑO PROTEINA (aa)**	**NÚMERO DE PARTÍCULAS POR VIRIÓN**	**FUNCIÓN**
1	2341	PB2 POLIMERASA	759	30-60	Trascriptasa; proteína que une ARN con cap (Cheung y Poon, 2007). Necesaria para la transcripción viral (Mahy, *et al., 1983*)
2	2341	PB1 POLIMERASA	757	30-60	Proteína más conservada, responsable de la polimerización, iniciación de la transcripción y elongación de la cadena, altamente conservada (Kawaoka, *et al., 1989;* Cheung y Poon, 2007)
	297	PB1 - F2	87-99		Induce la apoptosis de células del sistema inmune Transcriptasa. Alargamiento molecular. Actividad de endonucleasa. (Chen, *et al., 2001;* Zamarin, *et al., 2005*)

3	2233	PA POLIME RASA	716	30-60	Proteasa implicada en la replicación del ARN viral (Perales, *et al.,* 2000; Cheung y Poon, 2007).
	123-183	PA X	29		Reprime la expresión génica celular y modula la respuesta del huésped a la infección (Jagger,*et al*.,2012)
4	1778	HA	566	500	Glicoproteína de superficie. Proteína más abundante en la superficie del virión, unión de la partícula viral con los receptores de ácido siálico de la célula hospedera (Lamb y Krug, 1996; Shi, et al., 2014).
5	1565	NP	498	1000	Se asocia con segmentos de ARN para formar ribonucleoproteínas. Transporta el ARN viral (v-ARN) del núcleo al citoplasma (Nelson y Holmes, 2007).
6	1413	NA	454	100	Representa el 5% del total de proteínas del virión. Tetrámero, glicoproteína con actividad destructora del receptor mediante la escisión del ligando alfa entre un ácido siálico terminal y un residuo adyacente D-galactosa o D-galactosamina . Actividad neuraminidasa. Liberación de viriones maduros (Matrosovich, et al., 2004; Hensley, et al., 2011).

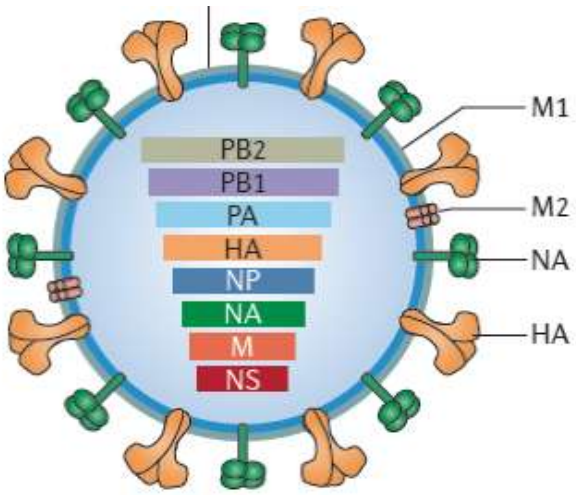
7	1027	M1	252	3000	Proteína más conservada del virus, Proteína matriz, soporte de la cápside. La proteína M1 forma una capa para separar la ribonucleoproteína (RNP) a partir de la membrana viral e interactúa con el ARN viral y componentes protéicos RNP durante el montaje y en el desmontaje del virus de Influenza. (Nelson y Holmes, 2007).
	316	M2	96		Forma el canal iónico para la regulación del pH dentro de la partícula viral, durante el proceso de replicación (Mould, *et al.,* 2000; Schnell y Zhou, 2008).
	276	?	9	?	mRNA empalmado
8	890	NS1	217		Proteína no estructural. antagonista viral del interferón, neutraliza señales inducidas por el ARN de doble cadena (Dauber, *et al.,* 2004*;* Yuan*,* et al., 2001)
		NS2	61		Proteína no estructural. exporta la ribonucleoproteína del núcleo al citoplasma para que interactúe con la proteína M (Imai,*et al.,* 2003)

Modificado de Lamb y Choppin (1983) y Hay (1998).

Los viriones son pleomórficos y exhiben una variedad de formas y tamaños que van de 50 a 120 nm de diámetro para las formas esféricas (Steinhauer y Skehel, 2002; Brown, 2000; Arias *et al.,* 2009). La morfología del virión está modelada por la proteína de matriz M1, y a su vez está rodeada por lípidos que constituyen la envoltura. En la superficie externa se ubican en relación intercalada 4-5 estructuras triméricas de las glicoproteína

HA y un tetrámero de la glicoproteína NA, proyectando aproximadamente 500 picos de estas estructuras (figura 1-1) (Nelson y Holmes, 2007).

Figura 1-1 Estructura del Virus de Influenza A



Representación esquemática de un virión de influenza A. **HA:** proteína hemaglutinina, **NA:** proteína neuraminidasa, **M1:** proteína de matrix, **M2:** proteína transmembranal, **NP:** nucleoproteína, **NS:** proteínas no-estructurales, **PA:** polimerasa ácida, **PB1:** polimerasa básica 1 **PB2:** polimerasa Básica 2. Tomado de Shi y col, 2014.

Basado en la antigenicidad de sus proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), los virus de influenza A se clasifican en diferentes subtipos: 18 subtipos de HA (H1 a H18) y 9-11 subtipos de NA (N1 a N9-11) (Fouchier *et al.*, 2005, Olsen, 2002; Tong *et al.,* 2012; Tong *et al.,* 2013); de éstos, 16 subtipos de HA y 9 subtipos de NA del virus de la influenza A han sido aislados de aves acuáticas y aves silvestres (Webster *et al.*,1992; Fouchier *et al.*, 2003), por lo cual las aves son consideradas el principal reservorio del virus de la influenza A (Webby y Webster , 2001). Los subtipos H7N7 y H3N8 son evidenciados en caballos (Webster, 1993; Wilson , 1993; Nicholson, *et al.*, 2003) y H1, H3 , N1 , N2 se han aislado consistentemente de cerdos (Nicholson, *et al.*, 2003, Chang, *et al*., 2009); los subtipos de HA, H17 y H18 han sido recientemente encontrados en murciélagos (Tong *et al.,* 2012, Tong *et al.,* 2013; Wu, *et al.,* 2014). En humanos, los

subtipos H1N1 y H3N2, circulan actualmente, sin embargo, los subtipos H7N3 y H7N7 se han visto asociados a cuadros de enfermedad que van de leve a grave y subtipos como H5N1 asociado a casos mortales (WHO, 2011). Las enfermedades humanas causadas por los virus de baja patogenicidad provenientes de aves (LPAI) han sido documentadas, incluyendo síntomas muy leves (por ejemplo, conjuntivitis). Entre los ejemplos de virus LPAI que han causado infecciones en humanos se incluyen: H7N7, H9N2 y H7N2.

1.1.1.1 Complejo Polimerasa

El complejo polimerasa es un heterotrímero constituído por las subunidades PB1, PB2 y PA, correspondientes a los 3 primeros segmentos del ARN del virus. PB2, es codificada por el segmento 1. Esta proteína migra al núcleo de la célula huésped y es necesaria para el inicio de la transcripción viral, debido a que reconoce y une la estructura 5´ cap del mRNA del huésped, para que sea usada como primer en la transcripción del mRNA viral (Cheung y Poon, 2007; Webster, *et al.,* 1992; Mahy, *et al., 1983*).

La subunidad PB1 esta codificada por el segmento 2 de ARN, constituye el núcleo del complejo polimerasa e interactúa con PB2 y PA, evolutivamente, es la más conservada y es responsable de la polimerización, iniciación de la transcripción y elongación de la cadena. Además de PB1, el segmento 2 codifica para la proteína PB1-F2, descubierta en 2001 (Chakrabarti y Pasricha, 2013) la cual se ha relacionado con un papel en la virulencia, asociándose con la inducción de apoptosis en las células del sistema inmune (Webster, *et al.,* 1992; Chen, *et al.,* 2001).

La subunidad PA, codificada por el segmento 3 del ARN, conocida como proteína ácida, posee una actividad proteasa que está implicada en la replicación del ARN viral (Perales,

et al., 2000; Cheung y Poon, 2007), además, el segmento 3 también codifica para una proteína conocida como PA X que reprime la expresión génica celular y modula la respuesta del huésped a la infección (Jagger,*et al*.,2012).

1.1.1.2 Hemaglutinina

La hemaglutinina (HA) es la glicoproteína de membrana codificada por el segmento 4 del ARN. Este segmento tiene 1765 nucleótidos de largo y un marco abierto de lectura de 1698 nucleótidos que codifican para una proteína de 566 aminoácidos que constituye el 40% de las proteínas del virus (Porter, *et al.*, 1979; Krystal, *et al.*, 1982). La HA es la responsable de la unión del virus a la membrana plasmática de la célula huésped por la unión al receptor de ácido siálico y de la fusión de las membranas una vez el virus ha penetrado a la célula (Wiley, 1987; Stevens, *et al*., 2006), además es uno de los antígenos virales contra los que se dirige una parte importante de la respuesta inmune neutralizante. El reconocimiento de las anticuerpos por la HA está relacionado a los cambios conformacionales de los epítopes de la proteína, que se encuentran en su mayoría en la región HA1, responsable de la antigenicidad. Estos epítopes son 5: A, B, C, D, y E, con 20 aminoácidos cada uno en la superficie de la proteína. Entre ellos se localizan los aminoácidos responsables de la unión a los receptores Siaα2- 3Gal y Siaα2-6G de ácido siálico de las vías respiratorias y / o el intestino del huésped que son altamente conservados y no tienen acceso a la unión con los anticuerpos (Lamb y Choppin, 1983; Paglini, 1999; Skehel y Wiley, 2000).

Dentro del marco abierto de lectura de la secuencia de nucleótidos del gen HA, se encuentra la secuencia que traduce para el péptido señal (1-51 nt) y las regiones que traducirán para los dos polipeptidos HA1 (52-1032 nt) y HA2 (1033-1698 nt) (Suzuki y Nei, 2002). La HA se sintetiza como un precursor de cadena única (HA0) en el retículo endoplasmático y se exporta a la superficie celular a través del aparato de Golgi. Este precursor es clivado proteolíticamente en la región del péptido señal en dos cadenas de polipéptidos HA1 y HA2 (Suzuki y Nei, 2001). El monómero de hemaglutinina tiene un tallo constituído principalmente por el péptido HA2, el cual se encuentra formado por dos hélices que en su parte basal sitúan el péptido de fusión hidrofóbico que sirve como punto de anclaje de la glicoproteína dentro de la bicapa de lípidos propia del virión (Wilson, *et al*., 1981). La subunidad HA1 forma una cabeza globular-membrana distal que contiene el sitio de unión al receptor y la mayoría de las regiones antigénicas inmunodominantes altamente variables que son reconocidas por los anticuerpos neutralizantes (Gerhard, *et al.,* 1981; Wiley y Skehel, 1987). Por otro lado, HA2 forma la mayor parte de la estructura de vástago la cuál es altamente conservada, contiene el péptido de fusión viral y ancla el dominio globular a la membrana viral (Chen, *et al.,* 1995; Chun, *et al.,* 2008).

Sobre la superficie de la molécula se disponen varias cadenas de carbohidratos que participan también como antígenos funcionales, cuatro cadenas de carbohidratos complejos en HA1 y uno en HA2 que consisten en N-acetilglucosamina, manosa, y galactosa y dos cadenas de carbohidratos simples en HA1 que consisten en N-acetil-glucosamina y manosa. Todas las cadenas están vinculadas a través de enlaces N-glicosídicos a residuos de asparagina (Wilson, *et al.*, 1981). Hay cuatro puentes disulfuro

en el interior de HA, uno en HA2, y uno en la unión de HA1 y HA2. Los sitios conservados de glicosilación son requeridos para la integridad estructural y la estabilidad durante el proceso de biosíntesis y formación de viriones (Chen, 2011), sin embargo, los cambios de aminoácidos en la proteína, pueden alterar el número y las posiciones de las glicosilaciones en la HA, posiblemente dando lugar a la deriva antigénica del virus de la influenza (Chen, *et a*l., 2011).

Es necesario el clivaje de HA0 para activar la fusión de la envoltura viral y la membrana del endosoma y por tanto es un determinante crítico de la patogenicidad y difusión de la infección (Klenk ket al., 1975; Lazarowitz, *et al.,* 1975; Lamb, 1989). El tropismo tisular y la capacidad para la dispersión sistémica dependen de la habilidad de la proteína HA para unirse a los receptores de ácido siálico en la célula huésped, de la distribución de proteasas del hospedador capaces de clivar HA0 y de las propiedades de clivaje del precursor de HA0 (Steinhauer, 1999). En cuanto a la conformación molecular, las hemaglutininas relacionadas con virus de Influenza de baja patogenicidad, poseen una única Arginina en el sitio de clivaje, mientras que las HA de virus de Influenza de alta patogenicidad, poseen múltiples residuos básicos en el sitio de clivaje (Bosh *et al*., 1981). Las proteasas que clivan HA son serin-proteasas, y se distribuyen en las células epiteliales del tracto respiratorio o gastrointestinal para las HA de los virus de baja patogenicidad y en las células a lo largo del cuerpo para las HA de los virus de alta patogenicidad (Steinhauer, 1999).

La variación antigénica de la HA es uno de los principales factores en la virulencia y transmisión del virus de Influenza (Steinhauer, 1999; Wilson, 1990; Shi, *et al.,* 2014).

Igualmente por ser el principal determinante antigénico, los cambios en la secuencia de aminoácidos de HA afectan la eficacia de la vacunación, debido a que esos cambios de aminoácidos a veces dan como resultado alteraciones en los números y en las posiciones de glicosilación en HA, permitiendo evadir la respuesta inmune (Wei, *et al.,* 2010; Skehel, *et al.,* 1984).

1.1.1.3 Nucleoproteína

La nucleoproteína codificada por el segmento 5 del ARN. Es el principal componente de la ribonucleoproteína, es altamente conservada entre las cepas virales, y corresponde a la segunda proteína más abundante en el virión y es transportada al núcleo de la célula huésped durante la replicación viral. La unión con el ARN se establece a través de residuos situados a lo largo de toda la molécula y también establece contactos específicos con la polimerasa PB1 y PB2. En el proceso de replicación del virus, NP provoca el cambio de la síntesis de ARNm por la síntesis de ARN viral y del templado ARN positivo para hacer más ARN viral (NP provoca el cambio de la síntesis de ARNm para la síntesis de ARNv y ARNc (Webster, *et al.,* 1992; Elton, *et al.,* 1999).

1.1.1.4 Neuraminidasa

La neuraminidasa es una enzima que hidroliza el enlace glicosídico que une por el grupo keto del ácido siálico (N - acetilneuramínico), el residuo de azúcar adyacente D-lactosa o D-galactosamina de las células del huésped (Varghese y Colman, 1991). La secuencia de aminoácidos de NA es codifica por el sexto segmento del ARN; existen nueve subtipos de NA para influenza A, y sólo un subtipo para los virus de influenza B y C (Colman, 1989).

Los 470 aminoácidos que hacen parte de la proteína NA, forman los dominios citoplasmático, trasmembranal, la cabeza y el tallo de la proteína. Un virion posee unos 50 tetrámeros de NA, situando en la cabeza, el sitio activo de la enzima y el dominio de unión al calcio que permite estabilizar la estructura de la enzima a pH bajo (Takahashi, *et al.,* 2003). Los residuos que representan la función catalítica de la NA (Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 y Tyr406) ubicados en la cabeza de la proteína, son constantes para todos los subtipos de NA del virus de influenza A. Esto funciona también para los aminoácidos, que forman la estructura tridimensional del sitio activo: Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp198, Ile222, Glu227, Glu277, Asp293, y Glu425. Los residuos de asparagina, que forman el sitio de glicosilación, son estrictamente conservados (específicamente, Asn146); los residuos de prolina y cisteína, que proporcionan el plegado requerido de la cadena del polipéptido y estabilizan la estructura tridimensional de la molécula, son también bastante conservados (Colman, 1989).

Las cadenas de carbohidratos están unidas a los residuos de Asn ubicados en las diferentes regiones de la cabeza de NA, en particular, unidos a asparagina 86, 234, 146 y 200. El sitio de glicosilación en Asn146 es conservado para todos los subtipos de NA (Varghese y Colman, 1991). La glicosilación de Asn146 parece tener una función reguladora, porque se ha demostrado que la cadena de hidratos de carbono en Asn146 afecta a la enzima NA, provocando una disminución de la actividad enzimática (Li, *et al*., 1993).

El sitio de unión al ácido N-Acetilneuramínico (Neu5Ac) se encuentra en los motivos 3 y 4 del bucle de la superficie de NA y comprende los residuos de aminoácidos funcionales Arg118 ,

Asp151 , Arg152 , Arg224 , Glu276 , Arg292 , Arg371 y Tyr406, y residuos de aminoácidos estructurales Glu119 , Arg156 , Trp178 , Ser179 , Asp (o Asn en N7 y N9) 198 , Ile222 , Glu227 , Glu277 , Asp293 , y Glu425. Los aminoácidos funcionales están en contacto directo con el ácido siálico, con exclusión de Arg224, cuya parte alifática no polar forma un contacto con el fragmento de glicerol del residuo Neu5Ac (Colman, *et la.,* 1993).

La neuraminidasa es relevante en diferentes etapas de la infección; en primer lugar, se considera que ayuda a que el virus se acerque a las células diana por escisión del ácido siálico de las mucinas de las vías respiratorias, lo que le permite encontrar su camino a las células blanco epiteliales (Matrosovich M, *et al.,* 2004). En segundo lugar, puede tomar parte en la fusión de las membranas virales y celulares (Wagner, *et al.,* 2000) y en tercer lugar, facilita la gemación de nuevos viriones (Wagner, *et al.,* 2000; Shtyrya, *et al.,* 2009). Los anticuerpos contra NA no neutralizan la infectividad, pero restringen múltiples ciclos de replicación (Lamb y Choppin, 1983).

1.1.1.5 Matriz

La proteína M1 es la más conservada del virus y es codificada por el segmento 7. Posee dos dominios, uno cargado positivamente que se une al ARN y otro hidrofóbico que se une a las membranas. Se sitúa principalmente en el citoplasma de la célula huésped pero también en el núcleo; es el factor esencial en la formación de partículas virales. La proteína de matriz forma una concha que rodea a las nucleocápsides del virión; desempeña un papel importante en la iniciación de ensamblaje de la progenie del virus (Webster, *et al.,* 1992).

La proteína M2 se encuentra en menor proporción en el virión y es codificada por un ARNm empalmado derivado del segmento 7, esta proteína se expresa de forma abundante en la membrana plasmática de la célula infectada y sirve como una señal para el transporte a la superficie celular (Lamb¸*et al.,* 1985). Forma el canal iónico para la regulación del pH dentro de la partícula viral, necesaria para la etapa de desnudación del virus en la célula. (Mould, *et al.,* 2000; Schnell y Zhou, 2008).

1.1.1.6 Proteínas no Estructurales

El segmento 8 de ARN codifica las dos proteínas no estructurales NS1 y NS2, a partir del transcripto primario y el transcripto procesado. Estas proteínas, en particular, NS1 son abundantes en la célula infectada (NS1 principalmente en el núcleo y luego se asocia a polisomas, NS2 principalmente en el citoplasma), pero no se incorporan en los viriones de la progenie. (Webster, *et al.,* 1992).

NS1 posee dos señales, una de transporte al núcleo y otra de exportación del núcleo; funciona como antagonista viral del interferon al bloquear la cascada del IFN, además, neutraliza las señales inducidas por ARN de doble cadena (Dauber, *et al.,* 2004*;* Yuan*,* et al., 2001).

NS2 tiene un papel principal en la exportación de la ribonucleoproteína desde el núcleo para que interaccione con la proteína M; después de separarse de la ribonucleoproteína, permanece unida con M (Imai, *et al.,* 2003).

1.1.2 Replicación del virus de Influenza

La entrada del virus a las células del tracto respiratorio es mediada por la proteína de superficie hemaglutinina que interactúa con los receptores de membrana que contienen glicanos con ácido siálico terminales (ASI) (Olsen, 2002). Seguido del reconocimiento inicial, el virión es englobado por endocitosis hasta penetrar en una vesícula endosómica que es acidificada hasta un pH 5, por el paso de protones a través de los canales iónicos formados por la proteína M2, disociando así las ribonucleoproteínas virales (RNA unido a NP y asociado al complejo polimerasa) de las proteínas de matriz M1. Esto lleva a que se genere un cambio conformacional en la proteína HA que conduce a la fusión de las membranas virales y endosomales (Lamb Choppin, 1983; Das, *et al.,* 2010).

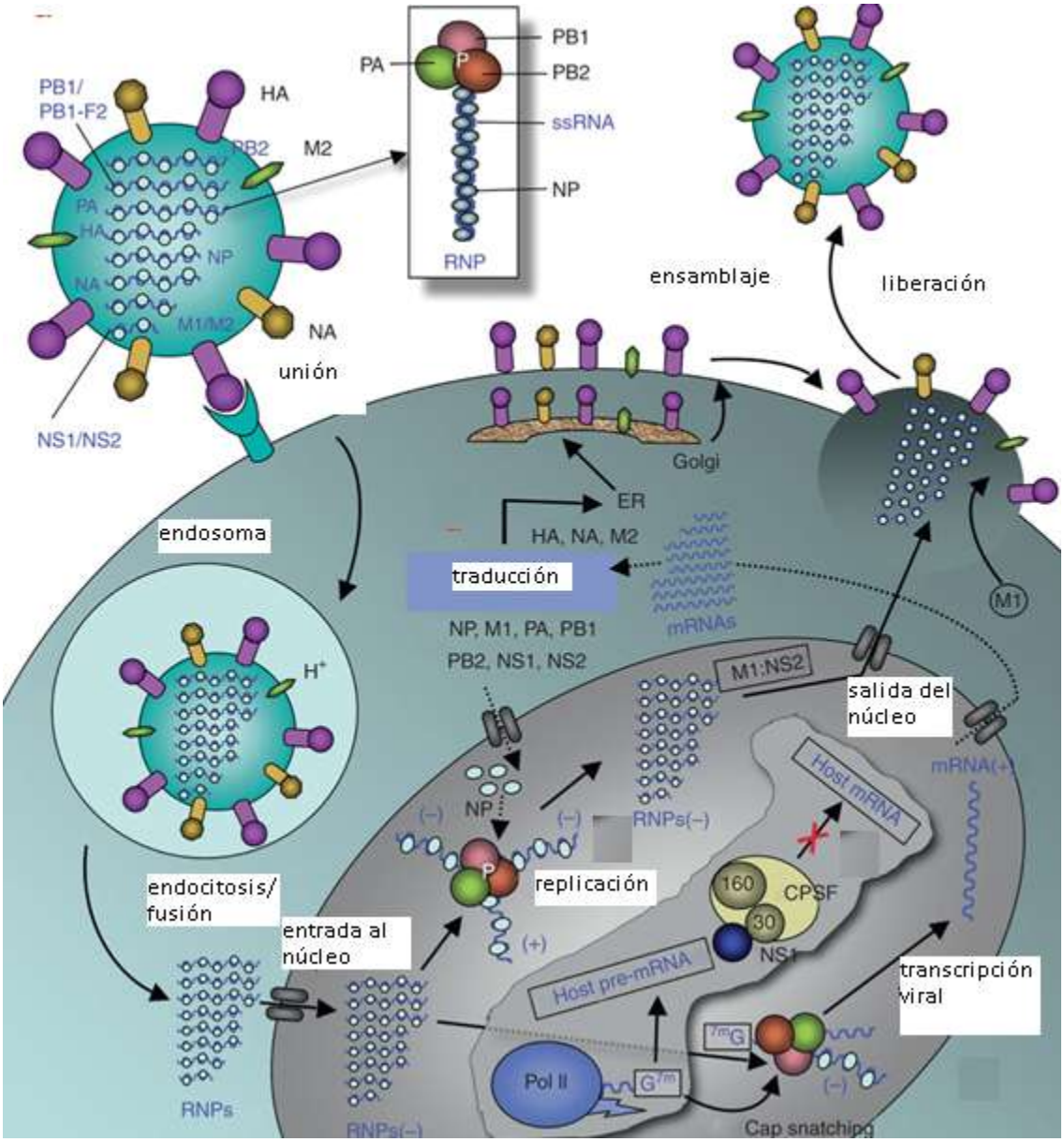
La macromolécula HA es clivada por enzimas semejantes a la tripsina, generando una hendidura molecular sobre la base del tallo, produciendo el péptido HA-1 con 329 aminoácidos y el péptido HA-2 que contiene 221 aa; ambos se encuentran unidos por un puente disulfuro entre la cisteína -14 de HA-1 y la cis -137 de HA-2. Cuando HA-2 se libera, queda expuesto el llamado «péptido de fusión» responsable de unir la cápside del virus con la membrana de la célula huésped, aunque HA-2 sirve también como punto de anclaje sobre la envoltura viral (Chen, *et a*l., 1998).

Una vez fusionada la membrana viral con la membrana del endosoma, los vRNPs que se liberan en el citoplasma, son transportados en el núcleo de la célula hospedera por el reconocimiento de las secuencias de localización nuclear (SNL) (Wu y Pante*,* 2009). Allí, el RNA (-) es copiado por la RNA polimerasa viral a RNAm viral adquiriendo

terminaciones cap 5´ (capsnatching) y una cola de poliadenilo (poli-A) en el extremo 3' de los pre-RNAm del hospedero (Plotch, *et al.,* 1981; Hagen, *et al.,* 1994). Luego, los RNAm son transportados al citoplasma y traducidos en las diferentes proteínas virales tanto estructurales como reguladoras. Los RNAm que codifican para las proteínas de la envoltura viral (HA, NA y M2) son traducidos por los ribosomas unidos al retículo endoplásmico, ingresando a la vía secretora de la célula hospedera donde la HA y NA son glicosiladas y transportadas a la membrana celular. Los RNAm restantes son traducidos por los ribosomas en el citoplasma y las proteínas PA, PB1, PB2 son importadas al núcleo, donde participan en la síntesis de cadenas positivas RNA (+) que sirven de molde para las cadenas de RNA (-), algunas de las cuales ingresan a la vía de la síntesis de RNAm, mientras que la proteína NP van a conformar las nucleocapsides (Flint *et al.,* 2004). Las proteínas M1 y NS1 son transportadas al núcleo y la unión de la proteína M1 a las nuevas cadenas de RNA (-) detiene la síntesis de RNAm viral y junto con la proteína NEP induce la exportación de la progenie de las nucleocápsides al citoplasma. Luego, las proteínas HA, NA y M2 son transportadas a la superficie celular donde se incorporan a la membrana plasmática. Las nucleocápsides del virión asociadas con las proteínas M1 y NEP son transportadas a la superficie celular y se asocian con las proteínas HA y NA. Las proteínas HA y NA de nuevos virus contienen terminales de ácido siálico que podrían causar que los virus se agrupen y se adhieran a la superficie de la célula. La NA de los virus recién formados escinde estos residuos de ácido siálico, liberando de este modo el virus de la célula huésped (Das, *et al.,* 2010). Por último, el ensamble de los viriones se completa una vez ocurre la gemación desde la membrana

plasmática de la célula infectada (Figura 1-2) (Smith y Hay, 1982; Nayak D. *et al*., 2009, Flint *et al.,* 2004).

Figura 1-2: Ciclo de replicación del virus de Influenza A.



La replicación del virus de influenza dentro de la célula huésped, es determinada por la unión entre la proteína HA y el receptor de la célula, entrando por endocitosis y dirigiendo la ribonucleoproteína al núcleo donde se lleva a cabo el proceso de replicación y transcripción viral. Tomado y modificado de Das y colaboradores, 2010

1.1.3. Variaciones Antigénicas

Los virus de influenza pueden adquirir rápidamente diversidad genética debido a diversos factores, incluyendo altas tasas de replicación en huéspedes infectados, una ARN polimerasa propensa a errores (que introduce mutaciones durante la replicación del genoma) y al reordenamiento de los segmentos. Las mutaciones que cambian los residuos de aminoácidos aparecen más a menudo que las mutaciones silenciosas en la evolución del gen de la hemaglutinina, particularmente en los epítopes de proteínas objetivo de los anticuerpos neutralizantes (Fitch, *et al.,* 1991; Fitch, *et al.,* 1997; Bush, *et al.,* 1999; Nelson, *et al.,* 2007, Torremorell, *et al.,* 2012). Esta observación indica que la selección para el cambio antigénico del virus es la fuerza impulsora en la 'carrera armamentista evolutiva' entre el virus y la inmunidad de las poblaciones afectadas, en otras palabras, el virus evoluciona para evadir la respuesta inmune del huésped (Grenfell, *et al.,* 2004). Los virus de influenza A son evolutivamente dinámicos y tienen una alta tasa de mutación de 0,6 $x10^{-3}$ sustituciones por sitio por año (Carter y Sanford, 2012), esto debido a que el virus tiene la capacidad de experimentar cambios antigénicos, que se producen por la deriva antigénica y el salto antigénico (Gangurde, *et al.,* 2011).

1.1.3.1 Deriva antigénica (*Antigenic drift*)

Proceso de cambio gradual y relativamente continuo en la proteína HA y la proteína NA , como resultado de la acumulación de mutaciones puntuales en sus respectivos genes durante la replicación viral. Las mutaciones que conllevan a cambios en los aminoácidos de las glicoproteínas de superficie HA y NA constituyentes de las porciones antigénicas del virus, pueden producir ventajas selectivas para cepas virales por permitir evadir la inmunidad preexistente en los huéspedes (WHO, 2011; Taubenberger y Kash, 2010; Holmes *et al*., 2005).

Las variaciones menores suponen la aparición de un virus con una HA y/o NA suficientemente distinta a la del virus precedente. La frecuencia con que ocurren espontáneamente estas mutaciones en la naturaleza es difícil de precisar, pero se sugiere una alta tasa por las experiencias de laboratorio para el gen HA, seguido por NA y en bajas tasas para los otros genes (Webster, *et al.,* 1992) cada una de estas mutaciones por la sustitución de uno o varios aminoácidos en la secuencia del producto genómico, que supone la inclusión equivocada de aminoácidos en la secuencia de las proteínas HA y NA, pueden resultar en la alteración de la estructura secundaria o terciaria de la glicoproteína alterando su forma y propiedades antigénicas, aunque muchas pueden ser deletéreas (Okasaki *et al.,* 1989).

1.1.3.2 Cambio o Salto antigénico (*Antigenic shift*)

Consiste en el rearreglo genético producto de la recombinación entre 1 o más cepas del virus. Debido a que el genoma del virus de influenza A es segmentado, la coinfección de una célula huésped con dos virus diferentes puede resultar en una progenie de virus que

contiene segmentos de genes de ambos virus parentales. Cuando este proceso de recombinación genética implica los segmentos de genes que codifican para la HA y / o NA se producen los cambios antigénicos, los cuales se dan con poca frecuencia, casi siempre son impredecibles, pero tienen la capacidad de producir pandemias (WHO, 2011; Taubenberger y Kash, 2010; Holmes *et al*., 2005).

Estas variaciones mayores o saltos antigénicos, implican un cambio total en la formación antigénica del virus afectando a HA y/o NA, que se traduce en la aparición de un subtipo nuevo. Para la aparición de estas variantes mayores, varios mecanismos epidemiológicos y biológicos pueden ocurrir: recombinación o reordenamiento génico de los genes que codifican para la glicoproteínas de superficie, la transmisión interespecie y la reaparición de un subtipo previo circulante desde un reservorio. Los 8 segmentos del virus pueden intercambiarse aleatoriamente y por consiguiente existen 256 posibles combinaciones que puede sufrir el virus aunque no todas son viables en la práctica (Scholtissek, 1978).

1.1.4 Evolución de los virus de influenza A

Los virus de Influenza A tienen una ecología muy dinámica y compleja, que involucra muchas especies hospederas y genes virales (Talledo y Zumaeta, 2009). Son los virus más estudiados debido a la importancia que tiene como patógeno humano (Nelson, *et al.,* 2007) y por tanto el entendimiento de la dinámica evolutiva del virus es importante para el control y la vigilancia epidemiológica del agente. Los procesos que juegan un rol importante en la evolución viral de Influenza A, son la deriva genética, la co-circulación de cepas diferentes genéticamente y los eventos de reordenamiento periódicos (Holmes, *et al.,* 2005; Nelson, *et al.,* 2006; Memoli, *et al.,* 2009).

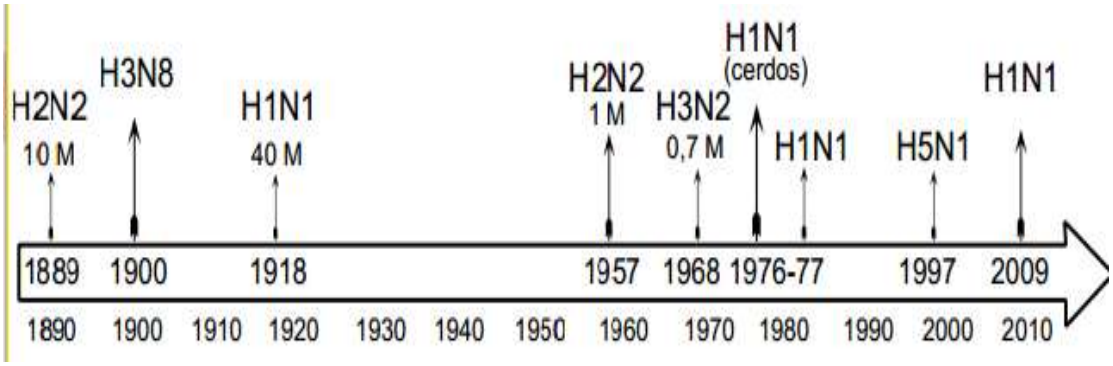
Como se mencionó previamente, los epítopes encontrados en HA y NA, son los residuos que se unen a los anticuerpos y en consecuencia tienden a evolucionar rápidamente para evadir la respuesta inmune del huésped (Laver, *et al.,* 1982; Blackburne, *et al.,* 2008). Sin embargo, las mutaciones que permiten escapar de la respuesta inmune también deben mantener la estabilidad y función de las proteínas. Como consecuencia de esto, se desarrollan una serie de mutaciones que permiten la epistasis positiva si se mantiene la estabilidad o negativa si por el contrario baja la capacidad replicativa del virus (SanJuan, *et al.* 2005; De Visser, *et al.,* 2007), de esto depende que el surgimiento de un nuevo subtipo o la deriva antigénica de uno circulante tengan o no éxito en la trasmisión e infección, por lo que se ha observado que cepas antigénicamente similares predominan por largos periodos de tiempo causando epidemias antes de ser sustituidas por nuevas cepas (McHardy, *et al.,* 2009).

El primer evento en la evolución de los virus de influenza, ocurrió al darse la divergencia entre los tipos A, B y C, la cual data de aproximadamente hace 8000 años (Suzuki, *et al.,* 2002). A su vez, la divergencia entre los virus de influenza A ocurrió hace aproximadamente 2000 años.

La evolución de los virus de influenza A, es más prominente a nivel de las glicoproteínas donde ocurre alrededor del 50% de los cambios nucleotídicos que resultan en cambios aminoacídicos (Air, *et al.,* 1990) pero también ocurren en cada uno de los seis genes internos, aunque con bajas tasas evolutivas o en proporción de cambios no codificantes (silenciosos) del 81-97% (Kawaoka, *et al.,* 1989). Un ejemplo de esa evolución de los

virus de influenza A es la relacionada con el subtipo H1N1, que ha circulado en tres periodos de tiempo con un gran impacto en la salud pública (Figura 1-3).

Figura 1-3. Esquema en el tiempo de las cepas de influenza A con importancia en eventos pandémicos.

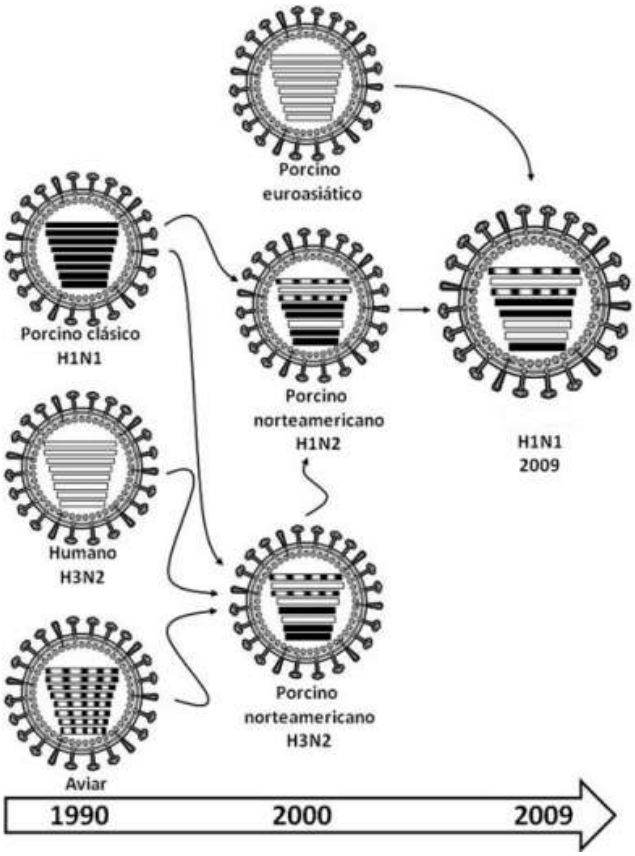


Aparición de las cepas de influenza A en eventos pandémicos a lo largo del tiempo.
Tomado de Talledo y Zumaeta, 2009

El primer periodo fue entre 1918 y 1957. En 1918 se originó la primera pandemia en humanos, durante la cual se presentó infección en poblaciones de cerdos, correspondiendo al virus de influenza clásica (Taubenberger, *et al.,* 2001); en 1947 y 1950, ocurrieron cambios en el virus que causaron fallas en el esquema vacunal y reportaron altas mortalidades. En el periodo de 1957 a 1968 la cepa A/H1N1 Clásica desapareció y surgió la cepa pandémica H2N2 (Scholtissek, *et al.,* 1978); Para 1977 H1N1 Clásica reaparece y se mantiene con manifestaciones estacionales en humanos y cerdos hasta 2009, cuando aparece una nueva pandemia producto del reordenamiento de tres cepas del virus Influenza A de diferentes orígenes H1N1 porcino clásico, H3N2 humano estacional y virus de Influenza aviar, las cuales entre 1998 y 2000 dan origen a un virus de reordenamiento triple, el virus Influenza A

H3N2 porcino norteamericano; este triple rearreglo H3N2 se recombina por reordenamiento con el virus predominante hasta ese momento, H1N1 porcino clásico, dando origen al virus H1N2 porcino norteamericano, que finalmente, por otro evento de reordenamiento con un virus de Influenza A porcino euroasiático, genera la nueva cepa de Influenza A/H1N1 2009 (Figura 1-4) (Trifonov et al. 2009a; Trifonov et al. 2009b; Nava et al. 2009; Wang y Palese 2009; Peiris et al. 2009).

Figura 1-4. Origen del virus de influenza A/H1N1 Pandémica



Representación de los eventos de reordenamiento que dieron origen al virus de influenza A/H1N1 Pandémica, producto de la recombinación de las cepas H3N2 porcino norteamericano, H1N2 porcino norteamericano y H1N1 porcino euroasiático. Tomado de Talledo y Zumaeta, 2009.

1.2. Influenza Porcina

1.2.1 Generalidades de la Influenza Porcina

La Influenza porcina es una infección viral generalizada y endémica en las poblaciones de cerdos en todo el mundo. Los subtipos más comunes del virus y los de mayor significancia patológica para el cerdo son H1N1, H3N2 y H1N2 (Nicholson, *et al.*, 2003, Chang, *et al*., 2009). Estos incluyen el virus de Influenza porcina clásica H1N1, H1N1 pandémica, H3N2 y los virus H1N2 de numerosos orígenes (Belshe, 2005; Brown, 2000), así mismo se han reportado los subtipos H3N3 y H4N6 aislados en cerdos en Canadá y Asia (Karasin, *et al.,* 2000; Karasin, *et al.,* 2004) y los subtipos H5N1 y H9N2 en Asia (Takano, *et al.,* 2009).

El virus de influenza se asocia al Complejo de Enfermedades Respiratorio Porcino (CERP), junto a otros agentes virales como el causante del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) y Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) y agentes bacterianos como *Mycoplasma hyopneumoniae* (Myh), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Pasteurella multocida* (Kim, J et al., 2003), ocasionando un problema sanitario serio que afecta principalmente a cerdos en crecimiento y finalización, caracterizándose por el crecimiento lento de los animales, la disminución en la eficiencia alimentaria, letárgico, anorexia, fiebre y tos. Aunque la etiología de CERP involucra múltiples patógenos y varía de granja a granja, diversos estudios asocian a la influenza porcina principalmente con *M. hyopneumonie* y PRRS (Dee, S., 1996; Thacker *et al*, 1999; Mancipe, *et al.,* 2012).

La importancia del estudio y control de la influenza porcina radica principalmente en el hecho de que el cerdo es visto como riesgo potencial de diseminación del virus entre especies siendo denominado como “vaso mezclador”, indicando la susceptibilidad de esta especie a los virus de influenza aviar y humano (Naffakh N. *et al*., 2009; Reeth K.V. *et al.,* 2006).

Desde el punto de vista epidemiológico la influenza porcina fue propuesta por primera vez como una enfermedad relacionada con la influenza humana durante la pandemia de 1918, cuando los cerdos se enfermaron al mismo tiempo que los seres humanos (CDC, 2009). La primera identificación de un virus de influenza como causa de enfermedad en los cerdos ocurrió alrededor de 10 años más tarde, en 1930. Así como la persistencia en los cerdos, los descendientes del virus de 1918 también han circulado en los seres humanos a través del siglo XX, contribuyendo a las epidemias estacionales normales de gripe (Olsen, 2002). Aunque la transmisión directa de los cerdos a los humanos es rara, la influenza porcina ha sido reportada en numerosas ocasiones como una zoonosis (Heinen, 2003), por lo general con una distribución limitada y la retención de cepas de influenza en cerdos, después de que éstas han desaparecido de los humanos, hace de los cerdos un reservorio donde los virus podrían persistir, para emerger y reinfectar una vez la inmunidad humana haya disminuido (Taubenberger y Morens, 2006).

En la industria británica de carne, se ha estimado que esta enfermedad produce pérdidas de al alrededor de £ 65 millones al año (Taubenberger y Morens, 2006) a su vez, Donovan reportó para el año 2008, que el virus de influenza porcina puede costar para la industria americana unos USD $10.31 por cerdo, atribuidos los costos a las pérdidas en la producción y los gastos relacionados con servicios veterinarios, pero estos costos en el sistema varían dependiendo de la cepa de influenza presente en la granja y de las infecciones concurrentes

con otros agentes patógenos (Donovan, 2008). En USA, tras los brotes de influenza porcina H1N1 pandémica en el 2009, se estima que los precios del cerdo bajaron, alcanzando un mínimo de USD $ 0.49 por libra para agosto, lo cual representaba la mitad del costo del año anterior por la disminución en el consumo de la carne, estimando que los productores de cerdo estadounidenses perdieron 13,64 dólares por cabeza de cerdo del 24 de abril al 2 de mayo del 2009 y la industria perdió cerca de USD $ 7,2 millones diarios de acuerdo con El National Pork Board (Khan, *et al.,* 2013). En otros países como Egipto, durante la pandemia de 2009 el país sacrificó toda su población porcina debido a la preocupación de que el virus de la influenza pandémica en los cerdos podría suponer un impacto sobre la salud pública (WHO, 2012).

En Colombia por su parte, el área económica de la Asociación Colombiana de Porcicultores estimó que las pérdidas del sector porcícola ocasionadas por el virus de influenza porcina AH1N1p fueron de $22,8 mil millones de pesos, solo teniendo en cuenta el diferencial entre el costo medio de producción por kilo y los precios pagados al productor en los meses de mayo, junio y julio del 2009 (Asociación Colombiana de Porcicultores, 2009b), por otra parte, como consecuencia de la pandemia, la Asociación Colombiana de Porcicultores (2009a) indicó que los porcicultores Colombianos perdieron tres mil millones de pesos por la disminución en la demanda de carne de cerdo, alcanzando pérdidas diarias de 580 millones de pesos.

1.2.2 Transmisión, Factores de Riesgo y Potencial Zoonótico del Virus de Influenza Porcina

La principal vía de transmisión del virus de Influenza Porcina es a través del contacto directo con secreciones provenientes de animales infectados (Shin, *et al.,* 2006). Estos contactos

estrechos son comunes durante el transporte de los animales y en la agricultura intensiva ya que los cerdos son criados en proximidad muy cercana entre sí (Gilchrist, *et al.,* 2007). La transmisión a través de los aerosoles producidos por los cerdos al toser o estornudar es también un medio importante de infección (Shin, *et al.,* 2006) principalmente porque las secreciones nasales contienen grandes concentraciones del virus durante la fase aguda febril y pueden ser eliminadas durante 6 o 7 días aproximadamente (Van Reeth, *et al.*, 2003). El virus generalmente se propaga rápidamente a través de una manada, infectando a todos los cerdos dentro de pocos días (Gilchrist, *et al.,* 2007). El curso y severidad de la enfermedad están asociados a la cepa viral actuante y a factores del huésped como la edad y la competencia del sistema inmune, asi como la infección secundaria por bacterias u otros virus (Nakharuthai, *et al*., 2008; Easterday *et al.,* 1999). Aunque la morbilidad suele ser del 100%, la mortalidad es menor al 1% y la recuperación de los animales se hace entre 7 a 10 días posinfeccion; las infecciones subclínicas son comunes y la mayoría de cerdos se pueden reinfectar con otras cepas sin mostrar signos clínicos (Reeth K. V. *et al.,* 2006).

Los brotes dentro de las granjas porcinas se relacionan principalmente con la introducción de animales nuevos infectados a poblaciones vulnerables y susceptibles y pueden ser observados durante todo el año, alcanzando su pico máximo en los meses más fríos, aunque se propaga lentamente y solo el 25-30% de los animales presenta signos clínicos (Nakamura, *et al*., 1972; Nakharuthai, *et al*., 2008).

Aunque la influenza porcina persiste como una infección endémica, tiene un potencial zoonótico por la característica de los cerdos de actuar como el recipiente potencial de mezcla de virus de influenza, lo que le brinda la posibilidad de generar nuevos subtipos (Gangurde,

et al., 2011). Esto se debe a que el tejido traqueal de los cerdos posee los tipos de vínculos de asociación de las moléculas de ácido siálico ligado a galactosa α 2-6 y α 2-3 reconocidos en la etapa inicial de la infección de las células huésped por la proteína de superficie HA de los virus de influenza; al poseer ambos receptores, los cerdos pueden ser infectados con virus de influenza de aves, los cuales reconocen principalmente los receptores de Siaα2-3Gal presentes en el epitelio gastrointestinal (donde el virus de la gripe se replica en hospedadores aviares) y con virus de influenza de mamíferos, que reconocen los receptores Siaα2- 6Gal, pudiendo ocurrir un reordenamiento dentro del cerdo que concluya en la generación de nuevas cepas por la coinfeccion de dos subtipos dentro de una misma célula hospedadora (Ma *et al.*, 2009; Kawaoka, 2012; Thacker y Janke, 2008).

1.2.3 Signos Clínicos

La influenza porcina se manifiesta como una enfermedad respiratoria aguda caracterizada por temperaturas corporales de 40,5ºC, inactividad, disminución de la ingesta de alimentos, dificultad respiratoria, tos, estornudos, conjuntivitis y secreción nasal; si no existen complicaciones por asociación con otros agentes infecciosos por lo general los signos clínicos mejoran en 10 a 14 días (Nakharuthai, *et al.*, 2008, Parmar, *et al*., 2011; Alexander y Brown, 2000; Richt, *et al*., 2003). Pero si se asocia con el complejo de enfermedad respiratoria porcina, puede producirse una mortalidad variable producto de complicaciones como la presentación de neumonía (Thacker, *et al.*, 2001; Ellis, *et al.*, 2004; Mancipe, 2012). En algunos casos, la infección puede causar el aborto (Shin, *et al.,* 2006).

1.2.4 Evolución del Virus de Influenza Porcina y su relación con la presentación de pandemias

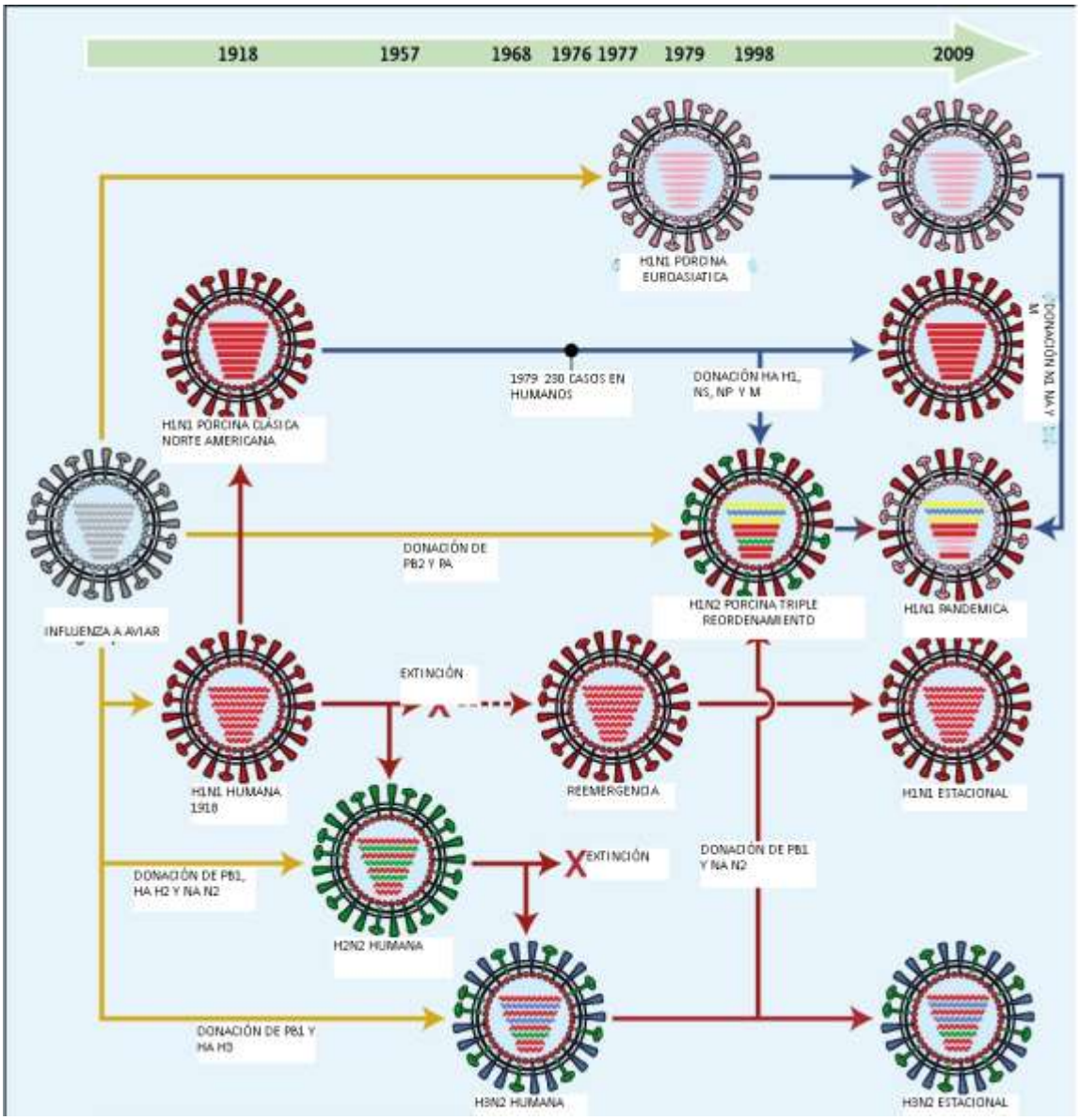
Debido a la capacidad de intercambio del material genético del virus de Influenza se han presentado a lo largo de la historia, varios eventos de reordenamiento, causantes de sintomatología clínica en humanos y cerdos, (Figura 1-5) (Morens, *et al.* 2009).

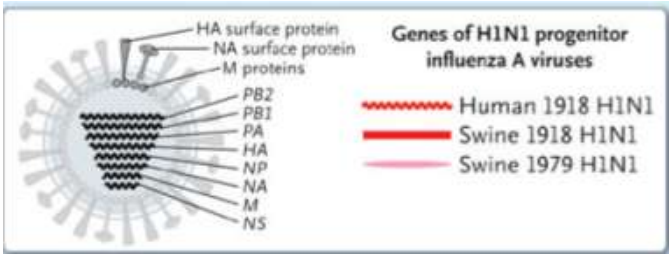
Las pandemias reportadas como consecuencia de los cambios genéticos del virus de Influenza ocurridas durante el siglo XX incluyen la "gripa española" que se presentó en el año 1918–1919, fué originada por el virus de influenza A del subtipo H1N1 (Reid, *et al.,* 2001), "la gripa asiática"en 1957–1958 originada por el virus de influenza A del subtipo H2N2 (Lipatov, *et al*., 2004), "la gripa de Hong Kong" en 1968–1969 causada por el virus de influenza A del subtipo H3N2 (Lipatov, *et al*., 2004) y en el siglo XXI la más reciente pandemia ocasionada por un virus de influenza A del subtipo H1N1 proveniente de porcino en el 2009 (Girard, *et al.,* 2010). Estas pandemias fueron causadas por virus de influenza A que habían sufrido grandes cambios genéticos y para la cual la población no poseía inmunidad significativa (Kay, *et al.,* 2003; Kilbourne, 2006). El virus de la gripe también ha causado varias amenazas de pandemia durante el siglo pasado, incluyendo la pseudo-pandemia de 1947, el brote de gripe porcina de 1976 y en 1977 la gripe Rusa, todo causado por el virus de Influenza del subtipo H1N1 (Hsieh, *et al.,* 2006)

En la Figura 1-5, se observa el reordenamiento que ha sufrido el virus de influenza desde la aparición en 1918 hasta el 2009, cuando se presenta la pandemia acasionada por virus del subtipo H1N1 pandémico. Los genes del virus de influenza A de 1918 del tipo H1N1 humana y porcina y los virus de influenza del tipo H1N1 de 1979 descienden a partir de genes de influenza A aviar. Los reordenamientos de los virus han llevado a la presencia de virus

estacionales en los cerdos y en los humanos, con capacidad de recombinarse y producir virus pandémicos como el H1N1p, producto del reordenamiento de H1N1 porcina Euroasiática con H1N2 porcina de triple reordenamiento entre H1N1 clásica, Influenza A aviar y H3N2 humana (Morens, *et al.,* 2009)

Figura 1-5. Reordenamiento genético del virus de influenza con referencia a virus de influenza humano y porcino





Las flechas amarillas reflejan la exportación de uno o más genes de la influenza A aviar. La flecha roja discontinua indica un período sin circulación. Flechas rojas continuas indican los caminos evolutivos de los linajes del virus de la Influenza humana; las flechas azules sólidas, con linajes del virus de influenza porcina; y la flecha azul a rojo, de un virus de influenza humana de origen porcino. Todos los virus de influenza A contienen ocho genes que codifican las siguientes proteínas (que se muestran de arriba a abajo dentro de cada virus): PB2 de la polimerasa básica 2, PB1 de la polimerasa básica 1, la polimerasa ácida PA, la hemaglutinina (HA), proteína nuclear (NP), neuraminidasa (NA), proteínas de la matriz (M), y las proteínas no estructurales (NS). Modificado de Morens y col. 2009.

En el virus de Influenza porcina, además de la presentación de diferentes subtipos, se evidencian diferentes linajes. Los principales linajes del virus de influenza porcina se asocian como linaje de América del Norte correspondiente a influenza porcina clásica (CS), influenza porcina avian-like europeo o euroasiático (EA) y virus de influenza porcina de triple reordenamiento circulante en el sur de China (Vijaykrishna, *et al.,* 2011) Los virus de influenza porcina A subtipo H1N1 actualmente circulan como dos linajes distintos dentro de América del Norte y Europa.

Los análisis filogenéticos han demostrado que existen distintos linajes de Influenza A, relacionadas con el tipo de huésped (Webster et al., 1992), pero debido a que se presenta transmisión inter especies y a que los segmentos se puede recombinar, han dado lugar a nuevos subtipos (Dunham et al., 2009; Smith et al, 2009). De esta manera, se relaciona con la aparición de linajes a estos eventos: (i) la transmisión de H1N1 aviar a cerdos en la década de 1970, creando el linaje H1N1 porcina euroasiática, que se encuentra predominantemente en Europa y Asia (Brown, *et al*., 1998); (ii) la recombinación entre H1N1 avian-like y virus humanos, resultando en la circulación de H1N2 y H3N2 recombinante entre la población porcina en Europa; (iii) el complejo H1N1, H1N2 y H3N2 recombinado de virus de aves, humanos y porcinos, que originaron el virus de influenza porcina de triple reordenamiento visto en cerdos principalmente en América del Norte a partir de la década de 1990 (Olsen, 2002); (iv) la recombinación entre los virus triple recombinante del linaje Norte Americano y H1N1 del linaje Eurasiático (i) y (iii), dio origen a la cepa pandémica H1N1 del 2009 (Garten *et al*, 2009; Smith, *et al*, 2009; Webby, *et al*., 2000; Zhou, *et al*, 1999).

El linaje eurasiático de la influenza porcina tipo A es particularmente notable, ya que representa una transferencia reciente y de gran éxito de las aves a los mamíferos. Cuando fue reportado por primera vez en Bélgica en 1979, poseía un genoma totalmente avian-like (Pensaert, *et al.,* 1981), y ya se ha establecido en las poblaciones porcinas europeas (Campitelli, *et al.,* 1997; Brown, 2000). Este virus posteriormente se extendió a Hong Kong y el sur de China en torno al cambio de milenio, donde sustituyeron en gran medida las cepas preexistentes (Vijaykrishna, *et al*., 2011).

Por el contrario, el linaje de influenza porcina clásica ha circulado entre los cerdos en América del Norte durante al menos 80 años, habiendo sido aislada por primera vez en 1930 y relacionada con la cepa pandémica humana de 1918 conocida como la 'gripe española'. Este virus clásico sigue circulando en Norteamérica y se ha detectado desde 1974 en Asia (Vijaykrishna, *et al*., 2011; Shortridge y Webster, 1979). Por su parte el triple recombinante del virus de influenza porcina surgió en los cerdos de Norteamérica en 1998 (Zhou, *et al*., 1999; Kanegae, *et al.,* 1994, Bhatt, *et al.,* 2013).

En cuanto al virus de influenza porcina se tiene que las primeras observaciones clínicas de la infección en cerdos, coincidieron con la presentación de la pandemia de 1918 en humanos (Reid, *et al.,* 2001), pero el aislamiento del virus de influenza porcina no se obtuvo sino hasta 1930 (Shope, 1931). Se propone que éste virus del subtipo H1N1, denominado virus de la influenza porcina clásica, surgió por transferencia del virus pandémico humano de 1918 a los cerdos y posteriormente se propagó a los porcinos en otras partes del mundo. Independientemente, un nuevo linaje de influenza porcina avian-like H1N1 surgió en Europa en el año 1979, sustituyendo al virus de la influenza porcina clásica (Brown, 2000). Hasta la fecha, este segundo linaje del virus de la influenza porcina es enzoótico en todas las regiones productoras de cerdos de Europa occidental, donde co-circulan con virus de los subtipos H3N2 y H1N2 (Maldonado, *et al.,* 2006). Se cree que los ocho segmentos de genes que conforman los virus de influenza H1N1 del linaje europeo derivan del virus de influenza de aves de Asia, determinando así un linaje filogenética y antigénicamente distinto del linaje del subtipo H1N1 del virus de influenza porcina clásica (Dunham, *et al.,* 2009

Antes de 1998 los virus de la influenza porcina del tipo H1N1 clásicos fueron aislados de los cerdos en los Estados Unidos. Desde 1998, un doble reordenamiento del subtipo H3N2 (humano / porcino,) y un triple reordenamiento entre los subtipos H3N2, H1N2 y H1N1 (aviar / porcina / humanos) del virus de la influenza porcina surgieron en los Estados Unidos y Canadá (Ma *et al.,* 2009a).

Con relación al virus doble recombinante H3N2, éste fue aislado por primera vez en cerdos que presentaban una grave enfermedad de tipo gripal en una granja en Carolina del Norte en 1998; el cual mostró en el análisis genético que poseía segmentos de genes similares a los del linaje de influenza porcina clásica (NS, NP, M, PB2 y PA) y un virus de la influenza humana (HA , NA y PB1) (Zhou, *et al.1999)*. En cuanto a los triples reordenamientos de los virus H3N2 aislados de cerdos en Minnesota, Iowa y Texas, estos contienen segmentos genéticos del virus de influenza porcina clásica (NS , NP y M), un virus humano (HA , NA y PB1) y un virus aviar (PB2 y PA) (Yu, *et al.,* 2008) . La principal diferencia entre los virus dobles y triples reagrupados fue la adquisición de dos genes de la polimerasa aviar (PA, PB2) en el triple recombinante H3N2 (Ma *et al.*, 2009).

Una vez establecido en la población porcina, el virus triple recombinante H3N2 evolucionó a través de la deriva genética y la recombinación con virus porcinos clásico H1N1, produciendo virus de genoma reordenado que han sido identificados incluyendo H1N2, H1N1 recombinante (rH1N1) y H3N1 (Lekcharoensuk, *et al.*, 2006; Ma, *et al.*, 2006; Webby *et al.*, 2004) todos estos genomas reordenados mantienen los genes internos (PB1 PB2 , PA , NP M , NS) del virus triple recombinante originales, esto se denomina triple recombinante del casete interno de gen (TRIG) (Vincent, *et al.,* 2008; Ma *et al.*, 2009a; Acosta, *et al.,* 2009, Jaime, *et al.,* 2011).

Los virus de la influenza H2N3 de triple recombinante tienen una leucina en la posición 226 y una glicina en la posición 228 de HA y causó enfermedad en los cerdos, siendo

altamente transmisible, aunque ha estado ausente desde 1968. Además, este virus es considerado similar a los virus de influenza del tipo H2N2 aislados de la pandemia humana de 1957 y encontrada en cerdos de Missouri en el año de 2006 (Ma *et al*., 2007) por lo que se cree puede representar un riesgo importante para la salud pública si es capaz de transmitirse a los seres humanos (Ma *et al.,* 2009ª).

En 2009, una pandemia con el virus de influenza A del subtipo H1N1 surgió en la población humana de América del Norte (Garten, 2009). El virus H1N1 que emergió se propagó rápidamente en la población alcanzando el nivel 6 de pandemia declarada por la Organización Mundial de la Salud el 11 de junio de 2009 (WHO, 2011; Vincent, *et al.*, 2010).

1.2.5 Influenza Porcina en América central, Suramérica y Colombia

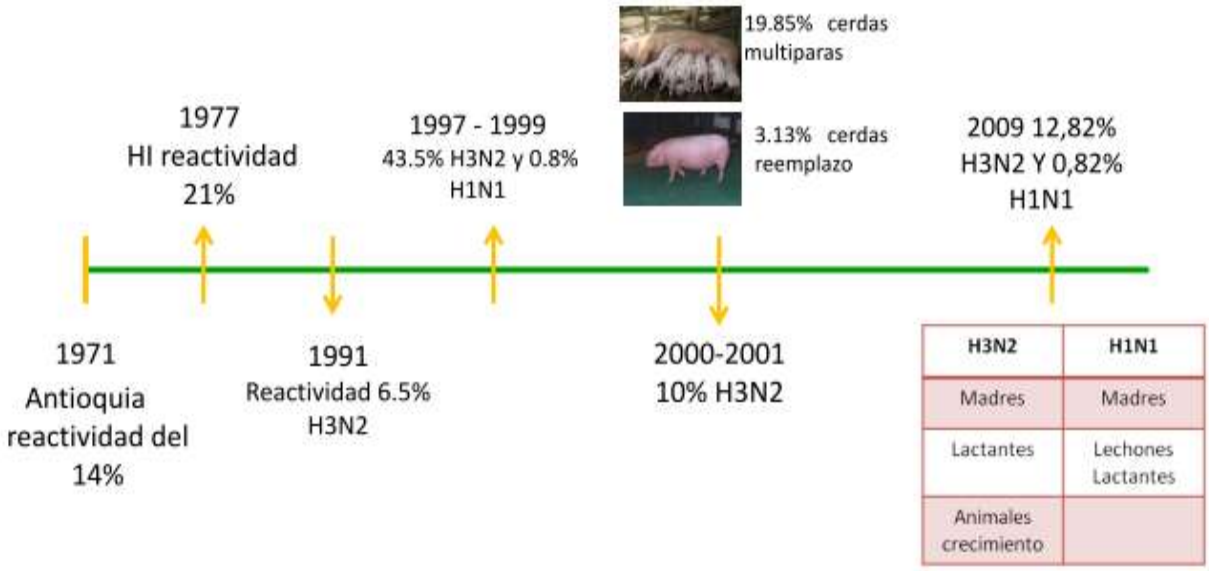
En Centro y Sudamérica es poca la información sobre la prevalencia del virus de influenza en cerdos. México ha publicado un reporte acerca de un aislamiento viral porcino estrechamente relacionado con el virus A/H1N1 pdm09 (Escalera et al., 2012), además, un estudio, en el que realizaron la caracterización genética de virus de influenza porcina aislados en México durante el 2009 y 2010, poco después de la pandemia, se evidenciaron divergencias entre las cepas circulantes con respecto a las pandémicas (Carrera, *et al.,* 2014). En Venezuela ha sido observada una reacción serológica positiva para virus de influenza porcina de 7,9% para el subtipo H1N1 y del 8,2% para el subtipo H3N2 (Boulanger, *et al.,* 2004). En Brasil, se reporta la circulación en la piaras de cerdos domésticos de los subtipos H1N1, H3N2 y H1N1 pandémica. En Chile, pruebas de ELISA mostraron que el 48% de los cerdos reaccionan positivamente a H1N1 y el 22% fueron

positivos para H3N2 (Ruiz 2011). En Argentina, un estudio serológico reportó virus de influenza porcina con una reacción positiva para el subtipo H1 del 41,2% y 41,6% para el subtipo H3 (Teodoroff, *et al.,* 2003; Pineyro, *et al*., 2006). Además, se ha reportado en este país la presencia de dos nuevos virus de influenza porcina en los cerdos resultado de dos eventos de recombinación independiente entre el virus de Influenza pandémico H1N1 y virus de influenza porcina estacionales human-like, que muestra la constante evolución de los virus de influenza y el riesgo potencial para la salud humana (Pereda *et al*., 2011).

En Colombia, el primer reporte que se relaciona con el virus de influenza porcina es un estudio de reactividad serológica en 1977 realizado utilizando sueros provenientes de cerdos del departamento de Antioquia, colectados en un período de dos años (1971-1972) y evaluados mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI), para los virus de influenza A/Hong Kong/1/68 (H3N2), A/Swine/Iowa/l5/30 (H1N1), y A/Swine/Wisconsin/ 1/73 (H1N1), encontrando una tasa de positividad del 14%, 34% y 21%, respectivamente (Hanssen, *et al*., 1977). En el año 1991 se estableció una reactividad del 6.5% para el subtipo H3N2 (Cucaita, 2005). Un monitoreo serológico realizado en Antioquia, entre los años 1997–1999 mostró una reactividad del 43.5% para el virus H3N2 y del 0.8% para el virus H1N1, entre los años 2000–2001 se reportó una reactividad del 10% para el subtipo H3N2 (Mogollón, *et al.,* 2003); para el año 2001, a través de la prueba de inhibición de hemaglutinación se observó una reactividad del 10% al virus A/SW/Texas/4199/H3N2 con una reactividad del 19.85% en cerdas multíparas y del 3.13% en cerdas de reemplazo (Moscoso y Neira, 2001). Durante 2008 y 2009 se demostró una reactividad serológica por individuo del 12.92% para el virus H3N2 y del

0.82% para el H1N1 en tres regiones de estudio del país (Antioquia, Occidental y Central) (Figura 1-6) (Jaime *et al.*, 2011). Además, se reportó el primer aislamiento de virus de influenza porcina en Colombia H1N1 pandémico y clásico (Ramírez-Nieto *et al.*, 2012).

Figura 1-6. Comportamiento serológico del virus de influenza en Colombia



Datos serológicos del virus de influenza porcina en Colombia reportados hasta 2011. Tomado de Jaime y colaboradores, 2011.

2. Materiales y métodos

2.1 Objetivo 1. Obtener la información sobre las secuencias de los virus de influenza porcina reportados en Colombia de 2008 a 2013 y comparar dichas secuencias a nivel de nucleótidos

Para cumplir con este objetivo, se analizó información proveniente de tres fuentes: material biológico correspondiente a aislamientos virales, recursos disponibles en las bases de datos y resultados de la evaluación de muestras de fluidos orales.

2.1.1 Aislamientos virales

Las muestras analizadas procedentes de aislamientos virales, corresponden al periodo de tiempo de 2008 a 2010 y pertenecen al banco de virus del laboratorio de Virología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia. Estas muestras son producto del trabajo realizado en el proyecto de investigación "Estudio sobre la influenza porcina en Colombia, aislamiento, diagnóstico y control" ejecutado por el grupo de investigación de Microbiología y Epidemiología, colectadas y aisladas de granjas de cerdos distribuidas en las 3 regiones de mayor producción de cerdos en Colombia ubicadas en los departamentos de Antioquia, Valle del Cauca y Cundinamarca, a partir de hisopados nasales tomados de animales con sintomatología respiratoria, tos, depresión y con temperatura rectal superior a 39°C. Las muestras fueron inoculadas en cultivos de la línea celular MDCK (Madin Darby Canine Kidney) lográndose el aislamiento de un total de 15 virus, los cuales fueron subtipificados mediante PCR en tiempo real identificando a

los virus como Influenza A por el gen M (InfA), influenza porcina dirigida por el gen NP (SwInfA) y H1N1 pandémica por el gen HA (SwH1)(CDC, 2009).

De los 15 virus aislados de hisopados nasales, 3 virus de influenza porcina del tipo H1N1 clásica provenientes de muestras colectadas en el año 2008 correspondieron a cerdos de pre-ceba del departamento de Antioquia. Los otros 12 fueron subtipificados como virus de influenza porcina del tipo H1N1 pandémica, de los cuales 8 virus fueron colectados en el 2009 en las regiones de Valle del Cauca y Antioquia y 4 fueron aislados de cerdos de Cundinamarca durante el año 2010.

De los 15 aislamientos de virus de influenza porcina, se seleccionaron 6 virus, de los cuales 5 correspondían a virus de influenza del tipo H1N1 pandémica y 1 virus correspondía a virus de influenza del tipo H1N1 clásico (Tabla 2-1). El virus de Influenza porcina Clásica fue colectado en el año 2008 en la región de Antioquia. De los virus pandémicos escogidos, correspondientes al año 2009, 3 fueron colectados de Antioquia y 1 del valle del Cauca, y del año 2010 se escogió un aislamiento procedente de la región de Cundinamarca.

Tabla 2-1. Aislamientos de SIV entre 2008 – 2010. Las muestras de influenza porcina analizados en este estudio, se encuentran resaltadas en la tabla.

IDENTIFICACIÓN	PROCEDEN-CIA	GRUPO ETAREO	SUB-TIPO	AÑO
A/Swine/Colombia/0102/2009	VALLE DEL CAUCA	PRECEBA	H1N1p	2009
A/Swine/Colombia/0201/2009	**ANTIOQUIA**	**CEBA**	**H1N1p**	**2009**
A/Swine/Colombia/0301/2009	**ANTIOQUIA**	**PRECEBA**	**H1N1p**	**2009**
A/Swine/Colombia/0401/2008	ANTIOQUIA	PRECEBA	H1N1c	2008
A/Swine/Colombia/0502/2009	VALLE DEL CAUCA	PRECEBA	H1N1p	2009
A/Swine/Colombia/0602/2009	VALLE DEL CAUCA	PRECEBA	H1N1p	2009
A/Swine/Colombia/0701/2009	ANTIOQUIA	PRECEBA	H1N1p	2009
A/Swine/Colombia/0801/2008	**ANTIOQUIA**	**PRECEBA**	**H1N1c**	**2008**
A/Swine/Colombia/0901/2008	ANTIOQUIA	PRECEBA	H1N1c	2008
A/Swine/Colombia/1002/2009	**VALLE DEL CAUCA**	**CEBA**	**H1N1p**	**2009**
A/Swine/Colombia/1101/2009	**ANTIOQUIA**	**PRECEBA**	**H1N1p**	**2009**
A/Swine/Colombia/1203/2010	CUNDINAMARCA	PRECEBA	H1N1p	2010
A/Swine/Colombia/1303/2010	CUNDINAMARCA	PRECEBA	H1N1p	2010
A/Swine/Colombia/1403/2010	CUNDINAMARCA	PRECEBA	H1N1p	2010
A/Swine/Colombia/1503/2010	**CUNDINAMARCA**	**PRECEBA**	**H1N1p**	**2010**

Tomado y modificado de Mancipe, 2012 y Ramirez-Nieto y col, 2012.

Las muestras seleccionadas corresponden a cepas circulantes en las granjas porcinas de Colombia en el años de 2008 a 2010, en tres de las regiones de mayor producción del país: Antioquia, Valle del Cauca y Cundinamarca y en diferentes etapas de producción.

2.1.2 Bases de Datos

Las muestras analizadas del periodo de 2011, corresponden a la información reportada a partir de un estudio desarrollado por Karlsson y col (2013) en la región de Los Llanos Orientales, alrededor de Villavicencio, Meta. Las muestras correspondientes a hisopados nasales fueron recolectadas de granjas de cerdo y mataderos e inoculadas en células MDCK, los resultados de 4 cepas de campo del virus de influenza porcina, fueron obtenidos de la base de datos Influenza Research Database (Tabla 2-2).

Tabla 2-2. Muestras de influenza Porcina correspondientes al periodo de 2011 disponibles en Influenza Research Database.

IDENTIFICACIÓN	GEN	CÓDIGO GenBank
A/SWINE/COLOMBIA/1/2011	HA	KC703326.1
A/SWINE/COLOMBIA/2/2011	HA	KC703349.1
A/SWINE/COLOMBIA/3/2011	HA	KC703320.1
A/SWINE/COLOMBIA/4/2011	HA	KC703314.1
A/SWINE/COLOMBIA/1/2011	NA	KC703323.1
A/SWINE/COLOMBIA/2/2011	NA	KC703346.1
A/SWINE/COLOMBIA/3/2011	NA	KC703317.1
A/SWINE/COLOMBIA/4/2011	NA	KC703311.1

2.1.3 Fluidos Orales

Las muestras del periodo de 2012 a 2013, son resultado de un proyecto piloto desarrollado en la región de Valle del Cauca por el grupo de investigación en Microbiología y Epidemiología Veterinaria, de la Facultad de Medicina veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional, el cual buscaba establecer la utilización de fluidos orales de cerdos de Pre-ceba para la detección del virus de Influenza en cerdos. Se hizo detección del virus de Influenza por PCR en tiempo real en el año 2013 y se realizaron intentos de aislamiento a partir de las muestras positivas en el año 2014, los cuales no fueron exitosos. Las muestras permanecieron almacenadas a -70ºC en el laboratorio de virología Veterinaria. Basados en esta información, se escogieron 4 muestras de fluidos orales que presentaron los CP más bajos (CP por debajo de 35 se consideran muestras positivas) para ser procesadas por PCR convencional.

2.1.4 Extracción de ARN Viral

La extracción de ARN total se realizó a partir de una alícuota de las muestras procedentes de aislamiento viral (2008 a 2010) y a partir de Fluído Oral (2012-2013), mediante el Kit QIAamp Viral RNeasy Mini Kit ® (Qiagen, Valencia, CA) con los procedimientos establecidos de acuerdo a la casa comercial. 140 µL de muestra fueron adicionados a 600 µL del Buffer RLT + βmercaptoetanol, realizando vortex por 1 minuto, para luego adicionar a 560 µL de etanol absoluto y resuspender por 15 segundos. 700 µL de la mezcla fueron transferidos a la columna de extracción y centrifugados por 30 segundos a 10000 rpm, descartando el líquido del tubo colector, esta acción se realizó dos veces. A la columna se le adicionaron 700 µL del buffer de lavado RW1 y se

centrifugó por 30 segundos a 10000 rpm. Tras cambiar el tubo colector, se agregaron 500 µL del buffer de lavado concentrado RPE y se centrifugó por 30 segundos a 10000 rpm; este procedimiento se realizó dos veces. Finalmente se depositó la columna en un tubo colector de 1.5 mL, y se adicionó 30 µL de agua libre de RNAsas, centrifugando nuevamente a 10000rpm por 1 minuto. Las muestras de ARN extraído fueron identificadas y almacenadas a -70ºC hasta su utilización.

2.1.5. Síntesis de cADN

Se realizó la síntesis del ADNc a partir de RNA viral mediante RT-PCR. Para esto, se mezcló 4µl de RNA viral con el primer Uni12 (Invitrogen®), 5'- UCGUUUUCGUCC -3' (Hoffman, *et.al*., 2001) y se empleó un volumen de reacción de 13 µl conteniendo 0,5µl de oligonucleótido 5µM, 2µl de dNTPs 10µM (Invitrogen·, Carlsbad, CA) y 6,5µl de H_2O y se incubó por un ciclo de 65°C durante 5 minutos. Posteriormente, se realizó la RT mediante el empleo de la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen®, Carlsbad, CA), 4µl tampón 10x, 1µl de DTT 0,1M (Invitrogen·, Carlsbad, CA), 1µl de RNAsa OUT (Invitrogen·, Carlsbad, CA) y se incubó durante 1h a 42°C. El ADNc fue almacenado a -20°C para usos posteriores.

2.1.6 Estrategia para la amplificación del gen de la Hemaglutinina (HA) y de Neuraminidasa (NA)

La estrategia utilizada para la amplificación del gen HA consistió en dividir el gen en dos fragmentos correspondientes a 931 pb y 1026 pb para lograr obtener la totalidad del segmento de HA, utilizando los juegos de oligonucleótidos universales reportados por

Hoffman y colaboradores (2001) para el gen HA y primers internos que se alinearan a la secuencia de gen para poder amplificar HA los cuales fueron donados amablemente por el Dr. Daniel Perez del Laboratorio de Influenza de la Universidad de Maryland – USA. (Tabla 2-3).

Tabla 2-3: Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen HA

FRAGMENTO	PRIMER		PRODUCTO
	NOMBRE	SECUENCIA	
HA1	BmHA 1F	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG (Hoffman, *et al.,*2001)	931 pb
	SwHA-931R	TCTGAAATGGGAGGCTGGTGTT (Maryland, University)	
HA2	SwHA-752F	TAGAGCCGGGAGACAAAATAACAT (Maryland, University)	1026 pb
	BmNs-890R	ATATCGTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT(Hoffman, et al.,2001)	

Primers para amplificar HA. Primers Universales de Hoffman (Hoffman, *et al.,* 2001) y primers para flanquear los extremos (Maryland, University).

Al igual que para el gen HA, la estrategia utilizada para la amplificación del gen NA también consistió en dividir el gen en dos fragmentos correspondientes a 720 pb y 1038 pb, utilizando los juegos de oligonucleótidos universales reportados por Hoffman y colaboradores (2001) para el gen NA y primers desarrollados para el gen NA donados amablemente por el Dr. Daniel Perez del Laboratorio de Influenza de la Universidad de Maryland – USA. (Tabla 2-4).

Tabla 2-4: Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen NA

FRAGMENTO	PRIMER		PRODUCTO
	NOMBRE	SECUENCIA	
NA1	BmNA 1F	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT (Hoffman, *et al.,*2001)	720 pb
	SwNA-720R	TTACTTGGTCCATCGGTCATTACA (Maryland, University)	
NA2	SwHA-375F	CCCCTTGGAATGCAGAACCTT (Maryland, University)	1038 pb
	BmNA-1413R	ATATCGTCGTATTAGTAGACAACAAGGAGTTTTT(Hoffman, et al.,2001)	

Primers para amplificar NA. Primers Universales de Hoffman (Hoffman, *et al.,* 2001) y primers para flanquear los extremos (Maryland, University).

2.1.7 PCR convencional para la amplificación de los genes HA y NA

La técnica de PCR se realizó de acuerdo a las recomendaciones generales descritas por la casa comercial productora de la enzima Taq ADN polimerasa platinum® (Invitrogen™, Carlsbad, CA).

Para la PCR se adicionó 2µl de ADNc a cada tubo con 23µl de mezcla para PCR, conteniendo 1µl de dNTPs 10µM (Invitrogen™), 0,75µl de cada oligonucleótidos en concentración de 20Mm (Tabla 5), 0,25 µl de Taq ADN polimerasa platinum® (Invitrogen™, Carlsbad, CA), 2.5 µl de tampón 10X y 1.5 µl de $MgCl_2$ 50x. Se utilizó un equipo Eppendorf® Mastercycler gradient, programado de la siguiente manera: 1 precalentamiento a 94°C durante 4 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación: denaturación: 20 segundos a 94°C, anillamiento: 30 segundos a 56°C y extensión: 7

minutos a 72°C para el gen HA y 5 minutos a 72ºC para el gen NA, un ciclo de finalización de 10 minutos a 72°C y 4°C hasta su finalización.

Los amplificados se evaluaron por electroforesis empleando un gel de agarosa grado Biología Molecular (Sigma®) al 1% a un voltaje constante de 100V durante 50 minutos empleando una fuente de poder Power-Pac 300 (Bio-Rad,, Hercules, CA). El marcador de peso molecular empleado fue GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder o λ Hind III (Fermentas™, Waltham, MA). Los amplificados se visualizaron mediante la tinción con EZ vision® (Amresco, Solon, OH) el cual cumplió la función de buffer de carga y de revelado para la visualización del gel; para la corrida electroforética se usó el tampón TAE 1X (Tris-Acetato 0.04 M, EDTA 1mM) y fueron evaluados en el fotodocumentador de Biorad® (Gel Doc 1000, CA).

2.1.8 Purificación y Secuenciación

Los productos de PCR de la amplificación de los genes HA y NA revelados en gel de agarosa al 1%, fueron purificados utilizando el kit de extracción en gel de Qiagen®, (Valencia, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se llevó a cabo la secuenciación por el método Sanger usando Big- Dye® Terminator Cycle Sequencing. Los productos purificados de cada PCR junto a los primers forward y Reverse utilizados para la amplificación (Tablas 2-3 y 2-4) y un primer interno que permitiera obtener el amplificado completo, correspondiente a 1778pb para el gen HA (Tabla 2-5) y 1413pb para el gen NA (Tabla 2-6) fueron enviados a Macrogen USA® para su procesamiento.

Tabla 2-5: Oligonucleótidos empleados para la secuenciación del gen HA.

FRAGMENTO	PRIMER	
	NOMBRE	SECUENCIA
HA1	BmHA 1F	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG (Hoffman, *et al.,*2001)
	SwHA-931R	TCTGAAATGGGAGGCTGGTGTT (Maryland, University)
	SwHA-521R	GGATTTGCTGAGCTTTGGGTATG(Maryland, University)
HA2	SwHA-752F	TAGAGCCGGGAGACAAAATAACAT (Maryland, University)
	BmNs-890R	ATATCGTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT(Hoffman, et al.,2001)
	SwHA-1213F	ACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAA(Maryland, University)

Primers para secuenciar HA. Primers Universales de Hoffman (Hoffman, *et al.*, 2001), primers para flanquear los extremos (Maryland, University) y primers internos (Maryland, University)

Tabla 2-6: Oligonucleótidos empleados para la secuenciación del gen NA.

FRAGMENTO	PRIMER	
	NOMBRE	SECUENCIA
NA1	BmNA 1F	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT (Hoffman, *et al.,*2001)
	SwNA-720R	TTACTTGGTCCATCGGTCATTACA (Maryland, University)
	SwNA-451R	GGGTTCGATATGGGCTCCTGTC (Maryland, University)
NA2	SwHA-375F	CCCCTTGGAATGCAGAACCTT (Maryland, University)
	BmNA-1413R	ATATCGTCGTATTAGTAGACAACAAGGAGTTTTT(Hoffman, et al.,2001)
	SwNA-949F	AGATGATAGCTCCAGAGAGCCTGATGATCC (Maryland, University)

Primers para secuenciar NA. Primers Universales de Hoffman (Hoffman, *et al.*, 2001), primers para flanquear los extremos (Maryland, University) y primers internos (Maryland, University)

Se llevó a cabo la secuenciación de las muestras mínimo por duplicado para cada uno de los genes y cada uno de los primers con el fin de garantizar la calidad de la secuenciación y tener suficientes datos para analizar y determinar la secuencia consenso de cada virus y cada gen.

2.2 Objetivo 2. Determinar los posibles cambios en las secuencias de los genes HA y NA de los virus de influenza porcina que tengan relevancia evolutiva basada en la literatura científica

2.2.1 Cambios en las Secuencias de las Glicoproteínas

Para la comparación de las secuencias de nucleótidos de los virus de Influenza Porcina, se utilizó el programa SeqMan pro, con el cual se realizaron los ensambles.

Utilizando EditSeq del paquete Lasergen (DNASTAR®, Madison, Wisconsin), se determinó la región codificante ORF dentro de las secuencias de nucleótidos de los virus analizados, para traducir la secuencia y obtener la proteína a partir de las secuencias de los genes de la HA y NA.

Utilizando el programa MEGA 6.0, se realizaron los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas traducidas por el método de CLUSTAL W, para determinar las posiciones en la cuales se evidenciaron diferencias en los aminoácidos.

Con el fin de determinar si estos cambios poseen relevancia evolutiva se compararon los resultados con la información obtenida a partir de la revisión de la literatura científica disponible.

En el Anexo A se encuentran relacionados los códigos del Genbank de las secuencias utilizadas para determinar los cambios de las secuencias para los genes NA y HA.

2.3 Objetivo 3. Establecer las relaciones filogenéticas de los virus de influenza porcina reportados en Colombia con la información encontrada en el Genbank y con los virus porcinos reportados en otras partes del mundo

2.3.1 Análisis Filogenético

Los resultados de las secuencias fueron analizados y editados usando el paquete de análisis de secuencias (DNASTAR®, Madison, Wisconsin) y los alineamientos de las secuencias se realizaron utilizando el programa Clustal W (Thompson, *et al.,* 1994).

El análisis filogenético para la determinación del árbol filogenético que permita establecer las relaciones evolutivas, fue realizado en el programa Mega versión 6.06 en el test estadístico de Neighbor-joining, bajo el modelo matemático de Kimura dos parámetros asume que las mutaciones (sustitución de nucleótidos) ocurren aleatoriamente, con un Bootstrap de 1000 réplicas (Saitou and Nei, 1987; Tamura *et al*., 2013).

En el Anexo B se encuentran relacionados los códigos del Genbank de las secuencias utilizadas para el análisis filogenético para los genes NA y HA.

3. Resultados y discusión

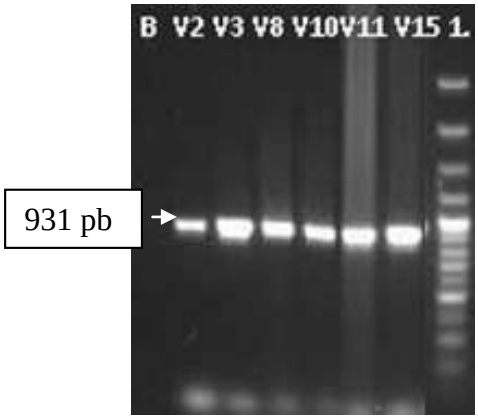
3.1 Objetivo 1. Obtener la información sobre las secuencias de los virus de influenza porcina reportados en Colombia entre los años 2008 a 2013 y comparar dichas secuencias a nivel de nucleótidos

3.1.1 Aislamientos virales

Empleando dos juegos de oligonucleótidos dirigidos para la amplificación completa de los genes que codifican para la HA y NA divididos en dos fragmentos para cada gen (Tabla 2-5 y 2-6) se obtuvieron productos de PCR para el gen HA de 931pb para el primer fragmento (Figura 3-1), y 1026pb para el segundo fragmento (Figura 3-2), y para el gen NA de 720pb para el primer fragmento (Figura 3-4) y de 1038pb para el segundo fragmento (Figura 3-5). En la electroforesis, se observaron dos bandas para el gen HA en la amplificación del segundo fragmento (Figura 3-2)(SwHA 752F- BmNS 890R), esto puede deberse a que los oligonucleótidos universales para amplificar los genes del virus de influenza A diseñados por Hoffman (2001) y empleados en éste trabajo, emplean el primer BmNS 890R el cual reconoce en el extremo 5´ la secuencia GUG, la cual es idéntica en las posiciones 14 a 16 en los genes que codifican para HA y NS (Hoffman *et al.,* 2001). Teniendo en cuenta ésta característica en las secuencias del gen HA, por la cual se presenta una unión inespecífica con otros segmentos del virus de influenza, se trata de compensar éste efecto, en el ciclo de la PCR utilizando una extensión más larga (7 minutos para el gen HA), logrando así incrementar y asegurar que fragmentos largos

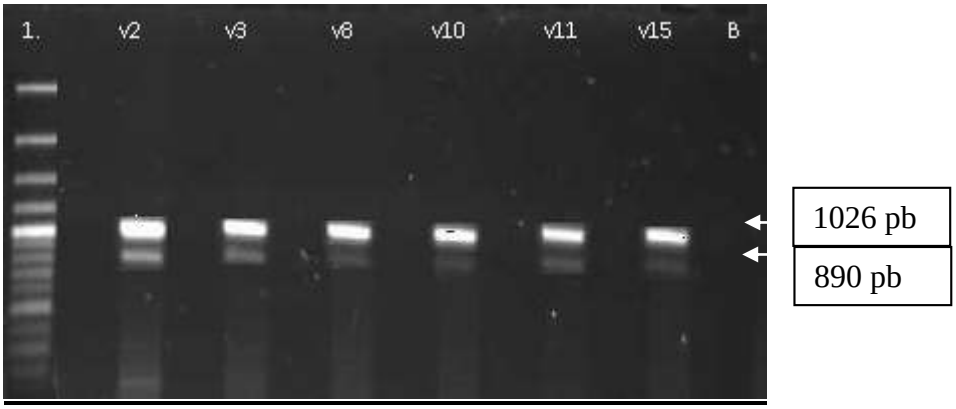
(HA ~1765 pb) de PCR sean producidos en situaciones donde la amplificación de un fragmento pequeño (NS 890 pb) compite con una reacción que produce fragmentos de PCR más largos, como ocurre al amplificar el gen HA utilizando el cebador Bm-NS-890R. En la normalización de la PCR para la amplificación del gen HA, la extensión de 7 minutos arrojó los mejores resultados. Esta situación no se presenta en la amplificación del primer segmento, debido a que el primer Bm HA1F posee una secuencia única (CC) en el extremo 3´ posiciones 13-14 altamente conservada en todos los subtipos de HA (Hoffman 2001); razón por la cual al utilizarse con el cebador SwHA 931R, no produce uniones inespecíficas a otros genes.

Figura 3-1: Amplificación del gen HA primer fragmento.



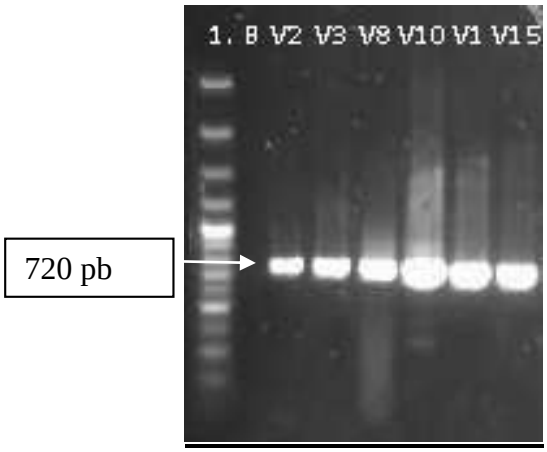
B: corresponde al control negativo o blanco En los siguientes 6 carriles, se encuentra el amplificado del fragmento 1 de HA correspondiente a 931 pb de los virus 2, 3, 8, 10, 11 y 15 respectivamente. Línea 1, en el extremo derecho: Marcador de peso molecular (MPM) de 100pb-3000pb.

Figura 3-2: Amplificación del gen HA segundo fragmento.



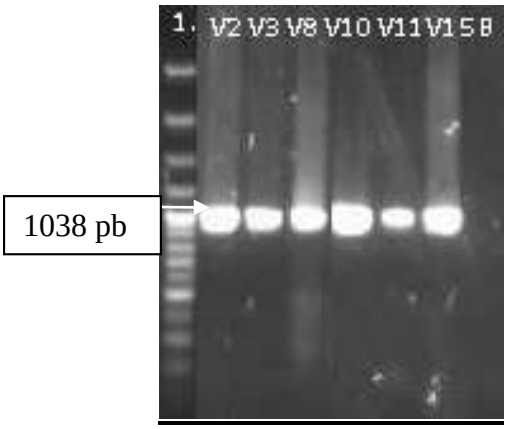
Líneas: 1. Marcador de peso molecular (MPM) de 100pb-3000pb En los siguientes 6 carriles se encuentra el amplificado del fragmento 2 de HA correspondiente a 1026 pb de los virus 2, 3, 8, 10, 11 y 15. Carril 8 corresponde al control negativo o blanco. Se observa la amplificación de una banda de tamaño aproximado de 890pb.

Figura 3-3: mplificación del gen NA primer fragmento.



Líneas: 1. Marcador de peso molecular (MPM) de 100pb-3000pb. Carril 2 corresponde al control negativo o blanco. En los siguientes 6 carriles se muestra el amplificado del fragmento 1 de NA correspondiente a 720 pb de los virus 2, 3, 8, 10, 11, y 15 respectivamente.

Figura 3-4: Amplificación del gen NA segundo fragmento.



Líneas: 1. Marcador de peso molecular (MPM) de 100pb-3000pb. En los siguientes 6 carriles se encuentra el amplificado del fragmento 2 de NA correspondiente a 1038pb de los virus 2, 3, 8, 10, 11 y 15. Carril 8 corresponde al control negativo o blanco

Con el fin de garantizar la purificación, únicamente del amplificado correspondiente a la longitud de los dos fragmentos del gen HA y NA respectivamente, las bandas obtenidas a la altura deseada se cortaron, se purificaron a partir de gel, y se verificó la pureza del producto de PCR para todos los fragmentos, obteniendo en promedio una concentración de 58,4ng/ul para cada producto de PCR del gen HA fragmento 1 y de 60,2 ng/ µl para el producto de PCR del gen HA fragmento 2 con un rango de pureza de A260: 1,88-1,99 y para el gen NA una concentración de 52.6 ng/ul para el fragmento 1 y de 56,2 ng/ µl para el producto de PCR del gen NA fragmento 2 con un rango de pureza de A260: 1,80-1,96.

Estos virus de Influenza Porcina fueron previamente analizados por Ramírez-Nieto y col (2012), para la subtipificación de Influenza por qPCR, determinando que los virus A/swine/Colombia/**0201**/2009,A/swine/Colombia/**0301**/2009,A/swine/Colombia/**1002**/2009 , A/swine/Colombia/**1101**/2009 y A/swine/Colombia/**1503**/2010 correspondían a virus de

influenza del tipo H1N1 pandémico (H1N1p) y el virus A/swine/Colombia/**0801**/2008, al virus de influenza del tipo H1N1 Clásico (H1N1c)

3.1.2 Bases de Datos

Las secuencias de los cuatro virus de influenza porcina correspondientes al año 2011, provenientes de los Llanos Orientales, fueron descargadas directamente del GenBank (Tabla 2-3), estas secuencias provienes de un estudio desarrollado para determinar la prevalencia de los virus de influenza en animales domésticos y aves silvestres de la región, a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos provenientes de cerdos de granjas y mataderos, y resultado de la amplificación de los genes HA y NA por PCR convencional. En los análisis realizados se evidenció que aunque son resultados importantes sobre la presencia de virus de influenza porcina en la región de los Llanos y corresponde a la única información disponible sobre este agente durante el año 2011, estas secuencias no estaban completamente curadas, lo que involucró que en el momento de los análisis presentaran discrepancias en los alineamientos.

3.1.3 Fluidos Orales

Las muestras de fluidos orales de los años 2012-2013, fueron positivas para Influenza A por qPCR, de acuerdo a los resultados de un proyecto piloto de detección de Influenza realizado por el grupo de investigación de Microbiología y Epidemiología; sin embargo, estas muestras no pudieron ser utilizadas y analizadas en este estudio ya que el material obtenido no presentó las características apropiadas para su amplificación por PCR convencional y secuenciación posterior por la no detección del virus en las muestras.

Las dificultades en la amplificación de estas muestras podría deberse a la degradación del genoma por la presencia de ARNasas propias de los fluidos orales (Vargas, 2010), aún cuando se utilizó kit comercial de extracción que permite eliminar inhibidores de la muestra, el tiempo de almacenamiento de los fluidos en congelación pudo afectar la calidad de la muestra, adicionalmente los intentos de aislamiento del virus en cultivo celular a partir de estas muestras fueron infructuosos como consecuencia de lo cual concluyó en la imposibilidad para amplificar los genes de HA y NA.

Sin embargo, con respecto al estudio al que se hace referencia en el párrafo anterior se evidenció que la muestra de fluidos orales en cerdos es una muestra viable para la detección de virus de influenza por qPCR (Detmer, *et al.,* 2011) reportándose una sensibilidad del 80.4% y una especificidad del 100% cuando las muestras son recolectadas en los días siguientes a la infección (Romagosa, *et al.,* 2012). Teniendo en cuenta lo anterior la toma de muestras de fluido oral puede ser una alternativa para el monitoreo de enfermedades poblacionales, debido a que no es una muestra invasiva y no requiere de equipos o materiales especiales (Prickett, *et al.,* 2008; Detmer, *et al.,* 2011).

3.1.4 Identificación de los cambios en la secuencia de los genes de HA y NA de los virus de influenza porcina Colombianos

Análisis de la secuencia del gen HA de los virus de Influenza porcina subtipo H1N1 pandémico Colombianos

Como resultados de la comparación entre alineamientos de secuencias de nucleótidos se determinaron 50 cambios entre los nueve virus de Influenza porcina del subtipo H1N1 pandémico Colombianos (Anexo 7.1).

De las variaciones encontradas entre las cepas, 29 corresponden a cambios que ocurren dentro de los virus de Influenza Porcina provenientes de la región de los Llanos Orientales obtenidas en el año 2011 comparándolos con los otros 6 virus. De estas variaciones, 20 corresponden a transiciones que no produjeron cambio en los aminoácidos por lo que son mutaciones sinónimas, pero los demás cambios a lo largo de la secuencia del gen HA, si evidenciaron cambios en la secuencia de aminoácido (Tabla 3-1); sin embargo, estas mutaciones No sinónimas (Tabla 3-2) no han sido reportadas en la literatura como cambios evolutivos en el virus, aún cuando se evidencian en el péptido de unión al receptor, lo que podría tener consecuencias asociadas a aumento o reducción de la avidez por los receptores y ameritan más estudios que determinen si estos cambios detectados solo en esta región de los Llanos, pueden considerarse importantes para la evolución y constante cambio del virus, o solo se debe a procesos de deriva genética propios del virus.

Tabla 3-1: Cambios en los nucleótidos del gen HA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémico de los Llanos Orientales Colombianos que originan variaciones en la proteína.

VIRUS	posiciones en la secuencia del gen HA								
	179	233	273	437	605	607	1084	1267	1403
A/Swine/Colombia/1(2011)	G	T	A	G	G	A	G	A	G
A/Swine/Colombia/2(2011)	G	T	A	G	G	A	G	A	G
A/Swine/Colombia/3(2011)	A	C	C	A	C	G	A	A	A
A/Swine/Colombia/4(2011)	A	T	C	A	C	G	A	G	A

Tabla 3-2: Mutaciones No sinónimas en la proteína HA de los virus de Influenza Porcina de los Llanos Orientales Colombianos.

VIRUS	posiciones en la Proteína del gen HA								
	60	78	91	146	202	203	362	423	468
A/Swine/Colombia/1(2011)	R	I	R	S	S	T	V	N	S
A/Swine/Colombia/2(2011)	R	I	R	S	S	T	V	N	S
A/Swine/Colombia/3(2011)	K	T	S	N	T	A	I	N	N
A/Swine/Colombia/4(2011)	K	I	S	N	T	A	I	D	N

Evaluando individualmente los virus de Influenza Porcina colombianos, la cepa A/Swine/Colombia/1503/2010 proveniente de Cundinamarca, es la que mayor número de variaciones individuales presenta (12 cambios), relacionado con los otros 8 virus pandémicos analizados; el 22% de las posiciones que mostraban diferencias entre las 9 secuencias se deben a los cambios en esta única cepa. Sin embargo, solo 5 de los cambios en la secuencia de nucleótidos para el gen HA de este virus del 2010, fueron asociados a mutaciones no sinónimas que presentaron una variación en la secuencia de aminoácidos (Tabla 3-3), todos presentes en la región de la proteína de unión al receptor, pero ninguno reportado en la literatura como cambio con importancia evolutiva para Influenza. Por lo cual, se podría sugerir evaluar los posibles efectos de estos cambios no reportados en el gen HA sobre la capacidad de unión a los diferentes tipos de receptores.

Tabla 3.3: Cambios en la secuencia de aminoácidos de la HA del virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémico A/Swine/Colombia/1503/2010

VIRUS	posiciones en la Proteína del gen HA				
	96	99	130	159	562
A/Swine/Colombia/1503(2010)	M	S	K	R	E

De los dos cambios encontrados en la secuencia del gen HA del virus de Influenza Porcina A/Swine/Colombia/1002/2009 proveniente del Valle del Cauca, uno demostró una mutación no sinónima causante del cambio de aminoácido S186P, el cual es reportado como una mutación asociada con el aumento de la avidez por el receptor α 2-3 (Das, *et al.,* 2011) lo que implica que esta cepa pudiera tener tropismo por tejido respiratorio en las aves, representando un riesgo en la transmisión inter especies del virus.

En el virus A/Swine/Colombia/1101/2009 de Antioquia, se encontró el cambio en la secuencia del aminoácido D144E con respecto a las demás secuencias analizadas, hasta el momento éste tampoco ha sido reportado como un cambio evolutivo en el virus.

En general, al analizar los 9 virus pandémicos, se encontraron 4 diferencias entre los virus de Influenza Porcina de la región de los Llanos orientales frente a los otros 5 virus provenientes de las regiones de Antioquia, Valle del Cauca y Cundinamarca, dichas diferencias fueron asociadas a transiciones (Tabla 3-4), de las cuales solo dos mutaciones produjeron cambios en la secuencia de la proteína D114N y E391K, los cuales no han sido reportados hasta el momento, sería importante analizar el posible papel que dichos cambios puedan tener en el proceso evolutivo del virus bajo las condiciones de las explotaciones porcícolas en Colombia..

Tabla 3.4: Cambios en los nucleótidos del gen HA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémico Colombianos que producen variaciones en la proteína.

	VIRUS	posiciones en la secuencia del gen HA			
		340	1071	1171	1296
Antioquia	A/Swine/Colombia/0201(2009)	G	A	G	T
	A/Swine/Colombia/0301(2009)	G	A	G	T
	A/Swine/Colombia/1101(2009)	G	A	G	T
Valle del Cauca	A/Swine/Colombia/1002(2009)	G	A	G	T
Cundinamarca	A/Swine/Colombia/1503(2010)	G	A	G	C
Llanos Orientales	A/Swine/Colombia/1(2011)	A	G	A	C
	A/Swine/Colombia/2(2011)	A	G	A	C
	A/Swine/Colombia/3(2011)	A	G	A	C
	A/Swine/Colombia/4(2011)	A	G	A	C

Al analizar la secuencia de nucleótidos de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémico correspondientes al año 2009, se evidencian dos variaciones que muestran cambios en la secuencia de aminoácidos de las posiciones T15A y R240Q de la proteína producto de eventos de transición entre los nucleótidos los cuales no han sido reportados previamente en la literatura como cambios evolutivos en el virus (Tabla 3-5), lo cual no descarta un posible papel en dicho proceso, por lo cual se deben seguir evaluando el papel de estas mutaciones en la proteína HA.

Tabla 3.5: Cambios en los aminoácidos del gen HA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémico correspondiente al año 2009.

VIRUS	posiciones en la proteína del gen HA	
	15	240
A/Swine/Colombia/0201(2009)	T	R
A/Swine/Colombia/0301(2009)	T	R
A/Swine/Colombia/1002(2009)	A	Q
A/Swine/Colombia/1101(2009)	T	Q

El análisis del gen HA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémico Colombianos, revela varias sustituciones en la secuencia de nucleótidos, la mayoría de estos producidos en el péptido de unión al receptor y el dominio antigénico, lo cual podría implicar un cambio en la antigenicidad. La mayoría de estas variaciones pueden provenir de la deriva antigénica del virus, un proceso relacionado con cambios evolutivos en el virus de influenza, lo que se evidencia porque aunque todos los aislamientos del 2009 al 2011, pertenecen al mismo subtipo del virus de influenza (H1N1 pandémico) y algunos provienen de las mismas regiones del país y fueron colectados en el mismo periodo de tiempo, presentan variaciones puntuales que los diferencian, aún cuando los cambios a nivel de aminoácidos sean mínimos, lo cual no excluye un efecto aditivo en el tiempo con repercusiones mayores sobre la secuencia de la proteína codificada. La mayoría de las variaciones en el gen HA de los virus del subtipo pandémico Colombianos, correspondieron a cambios silenciosos que no causaron sustituciones en la secuencia de aminoácidos y las que si presentaron variaciones, no han sido asociadas a cambios antigénicos de la proteína HA, sin embargo, estos cambios se pueden asociar a

sustituciones que se dan en respuesta a la presión inmune, o a la necesidad de mantener la estabilidad de la proteína y su función (De Visser, *et al.,* 2007). Es importante sin embargo anotar que una excepción a lo anterior la constituye el cambio S186P encontrado en el virus A/Swine/Colombia/1002(2009), que si se reporta como mutación que favorece el aumento de la avidez por el receptor α 2-3.

3.1.6 Análisis de la secuencia del gen HA de los virus de Influenza porcina subtipo H1N1 clásico Colombianos

En el caso de los virus de influenza porcina del tipo H1N1 clásico, como resultado de los alineamientos de las secuencias del virus A/Swine/Colombia/0801/2008 correspondientes a Influenza Porcina subtipo H1N1 clásico, con la secuencia A/swine/Colombia/0401/2008 Gb: JX826516.1, publicado por Ramírez-Nieto y col (2012) ambas cepas provenientes de animales del departamento de Antioquia, Colombia recolectadas en el año 2008, se observó un total de 16 cambios a lo largo de la secuencia (Tabla 3-6).

Tabla 3-6: Variaciones en el gen HA entre los virus de influenza Porcina H1N1 clásico Colombianos.

VIRUS	POSICIÓN EN LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL GEN HA (1701 pb LONGITUD TOTAL)															
	201	261	262	263	342	504	506	507	510	511	513	515	914	918	924	927
A/Swine/Colombia/0801(2008)	G	C	T	C	T	A	G	T	A	G	A	G	C	C	A	T
A/swine/Colombia/0401/2008	A	G	C	T	C	G	T	A	G	A	G	A	G	T	T	C

Estos cambios, corresponden al 0,94% de variación, entre transversiones y transiciones, en el total del marco abierto de lectura. Las transiciones corresponden al 75% de las variaciones en las secuencias (12 cambios) de los cuales 58,3% son transiciones A-G/G-A (7 cambios) y 41,71% son transiciones T-C/C-T (5 cambios). Por su parte las variaciones atribuidas a transversiones corresponde al 25% (4 cambios), generados por 50% transversiones A-T/T-A (2 cambios) y 25% transversiones G-C/C-G (1 cambio) y 25% transversiones G-T/T-G (1 cambio).

Estas variaciones entre las secuencias de nucleótidos de los virus de influenza porcina A/Swine/Colombia/0801/2008 y A/Swine/Colombia/0401/2008 encontradas, produjeron 5 cambios significativos, correspondientes a mutaciones no sinónimas (Tabla 3-7), que puede indicar una evolución distinta causada por deriva genética, aún cuando estas cepas fueron recolectadas durante el mismo año, en el mismo lugar de procedencia y pertenecen al subtipo H1N1clásico, sin embargo, ninguno de estos cambios entre las dos secuencias no ha sido reportado como capaz de afectar la antigenicidad de la proteína HA, pero al ser procedentes de la misma región y del mismo grupo etáreo, puede considerarse a estos cambios, como variación en las tasas de sustitución entre los virus de influenza por la fuerza de presión de selección inmune, o sea las mutaciones que permiten escapar de la respuesta inmune (SanJuan, *et al.* 2005; De Visser, *et al.,* 2007), debido a que se relaciona con posibles cambios en la conformación de los epítopes de la proteina provocando que los anticuerpos no se unan y los neutralicen.

Tabla 3-7: Cambios en los aminoácidos del gen HA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 clásico correspondientes a 2008.

VIRUS	PROTEÍNA HA (566 AA DE LONGITUD)				
	88	169	171	172	305
A/Swine/Colombia/0801(2008)	S	G	E	G	T
A/swine/Colombia/0401/2008	L	V	K	E	S

3.1.7 Análisis de la secuencia del gen NA de los virus de influenza porcina subtipo H1N1 pandémico Colombianos

En las comparaciones entre alineamientos de las secuencias de nucleótidos del gen NA de los virus de influenza porcina H1N1 pandémicos Colombianos, se determinaron solo 16 cambios entre cepas, diferenciándose además en el hecho de que los virus de influenza porcina de la región de los Llanos Orientales no presentaron cambios entre ellos (Anexo 7-2). En un primer análisis de las secuencias, realizando los alineamientos con el software Lasergen (DNASTAR®, Madison, Wisconsin) se evidenciaron un total de 24 variaciones, de las cuales 8 fueron causadas por las 4 secuencias analizadas de los Llanos para el gen NA, que no estaban completamente curadas, razón por la cual no fueron tenidas en cuenta para el análisis. (Anexo 6-2), lo que imposibilita saber si existían realmente cambios en estas 8 regiones del gen NA y si se relacionaban con algún tipo de cambio evolutivo del gen.

Las variaciones a lo largo de la secuencia del gen NA, solo produjeron 4 mutaciones (Tabla 3-8), de las cuales 2 se encontraron asociadas a la variación del gen NA del virus

A/Swine/Colombia/1503/2010, produciendo cambios de aminoácido en las posiciones 85 y 95, y las demás correspondieron a diferencias entre los virus de influenza porcina de los Llanos orientales aislados en 2011 y los virus de Influenza Porcina de las otras tres regiones colectados del 2009 a 2010, produciendo cambios en la secuencia de los aminoácidos en las posiciones 241 y 269.

Tabla 3-8: Cambios en los aminoácidos del gen NA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémicos Colombianos

	VIRUS	PROTEÍNA NA (454 AA DE LONGITUD)			
		85	95	241	369
Antioquia	A/Swine/Colombia/0201(2009)	L	S	V	N
	A/Swine/Colombia/0301(2009)	L	S	V	N
	A/Swine/Colombia/1002(2009)	L	S	V	N
Valle del Cauca	A/Swine/Colombia/1101(2009)	L	S	V	N
Cundinamarca	A/Swine/Colombia/1503(2010)	I	N	V	N
Llanos Orientales	A/Swine/Colombia/1(2011)	L	S	I	K
	A/Swine/Colombia/2(2011)	L	S	I	K
	A/Swine/Colombia/3(2011)	L	S	I	K
	A/Swine/Colombia/4(2011)	L	S	I	K

Al igual que como ocurrió en los análisis de cambios de nucleótidos para el gen HA, el virus A/Swine/Colombia/1503/2010 presenta variaciones individuales representativas que producen mutaciones No sinónimas y lo diferencian de los 8 virus de Influenza porcina

analizados correspondientes a H1N1 pandémico, lo que indica que ha sufrido de un mayor número de sustituciones a nivel de nucleótidos con relación a las demás cepas analizadas en este estudio. Adicionalmente, este virus es el único proveniente de la región de Cundinamarca y colectado en el año 2010; una región que por su posición, posee factores ambientales que la diferencian de las otras regiones principalmente por ser de clima frio, lo que incrementa el factor de riesgo para la transmisión del virus (Nakharuthai, *et al*., 2008), retando el estado inmune del animal y llevando a que el virus trate de vencer la presión inmune, mutando (SanJuan, *et al.* 2005; De Visser, *et al.,* 2007). Además, con relación a los demás virus de Influenza porcina, este es el único evaluado perteneciente al año 2010, y considerando lo reportado en la literatura es de esperar que tendrá una mayor cantidad de cambios en la secuencia de nucleótidos con respecto a los virus del 2009, debido a que la acumulación de mutaciones en la secuencia de nucleótidos para el virus de influenza se estima en 14, o sea 1.1×10^{-3} mutaciones por sitio por año (Ferguson, *et al.,* 2003; Gorman, *et al.,* 1990; Carter y Sanford, 2012).

Aún cuando se evidencian estos cambios en las posiciones 85 y 95 de la secuencia de aminoácidos de la proteína NA del virus A/Swine/Colombia/1503/2010, no han sido reportados en la literatura respecto a otros aislamientos de virus de influenza pandémicos, por lo tanto se desconoce si pueden estar relacionadas con algún tipo de cambio evolutivo en el gen; sin embargo, la sustitución N369K presente en la cepas de influenza porcina de los Llanos Orientales, ha sido observada en cepas aisladas en Brasil en el 2012 y la variación V241I también ha sido observada en cepas humanas de Uruguay en 2013. Aunque hasta el momento ninguna de estas sustituciones parece

afectar la antigenicidad de la proteína NA (Comas, *et al.,* 2014), es importante seguir evaluando el posible cambio evolutivo que traigan estas modificaciones de la proteína para el virus de Influenza porcina

3.1.8 Análisis de la secuencia del gen NA del virus de Influenza porcina subtipo H1N1 clásico Colombiano

Los análisis de variación entre secuencias del gen NA de los virus de influenza porcina del subtipo H1N1 clásico colombianos, no pudieron ser realizados, debido a que no se encuentra información disponible correspondiente a este subtipo en el país; por consiguiente, estos son los primeros datos que se tienen al respecto, sobre la secuencia de nucleótidos del virus clásico.

Sin embargo, en análisis anteriores realizados por Ramirez-Nieto y colaboradores (2012), el virus de influenza porcina clásico Colombiano A/Swine/Colombia/0401/2008 fue filogenéticamente relacionado con el virus A/Swine/Guangdong/L3/2009 Gb: ADW01465.1 (Kong, *et al.,* 2011) correspondiente a virus de influenza del tipo H1N1 clásica, por lo cual se realizó el análisis de variación de nucleótidos para el gen NA con la cepa clásica Colombiana, encontrando 19 cambios en la secuencia (Tabla 3-9) de los cuales, solo 10 resultan en una variación en el aminoácido entre los dos virus (Tabla 3-10), de las cuales, ninguna ha sido reportada o relacionada con cambios antigénicos en la proteína NA.

Tabla 3-9: Cambios en la secuencia de nucleótidos del gen NA entre los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 clásico Colombiano.

VIRUS	POSICIÓN EN LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL GEN NA (1410 pb LONGITUD TOTAL)																		
	7	18	33	36	83	108	118	119	121	123	124	132	135	136	137	140	141	232	314
A/Swine/Colombia/0801(2008)	C	G	T	G	A	C	C	T	G	G	A	T	G	A	T	T	C	C	A
A/Swine/Guangdong/L3/2009(H1N1)	A	A	G	A	G	T	A	C	A	A	G	C	T	C	C	A	A	A	G

Tabla 3-10: Cambios en la secuencia de aminoácidos del gen NA entre el virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 clásico Colombiano y la cepa de referencia.

VIRUS	PROTEÍNA NA (454 AA DE LONGITUD)									
	3	28	40	41	42	45	46	47	78	105
A/Swine/Colombia/0801(2008)	P	N	L	G	N	Q	I	V	Q	D
A/Swine/Guangdong/L3/2009(H1N1)	T	S	T	R	D	H	P	E	K	G

En conclusión tenemos que en Colombia se evidenció la presencia del virus de influenza porcina del tipo H1N1 clásico desde los años 70 y a partir de ese momento se mantuvo presente en las poblaciones porcícolas de acuerdo con los resultados de análisis serológicos llevados cabo en el país (Hanssen, *et al*., 1977; Moscoso y Neira, 2001; Mogollón, *et al.,* 2003; Cucaita, 2005). A pesar de esto, la primera detección molecular y aislamiento de virus de campo solo fue realizada en el año 2008 proveniente de muestras de hisopados nasales de cerdos de la región Antioqueña, identificando el subtipo de virus de influenza como H1H1 clásico, posteriormente y como consecuencia de la

diseminación del virus del tipo H1N1 que ocasionó la pandemia por virus de Influenza en el 2009, en ese trabajo también se identificó la presencia de virus de influenza porcina del tipo H1N1 pandémico en muestras colectadas entre los años 2009 y 2010 en las zonas de mayor producción porcícola (Ramirez-Nieto, *et al.,* 2012), observándose como este subtipo causaba una epidemia completa que lo llevó a convertirse rápidamente en el virus de influenza predominante desplazando a las cepas de los subtipo H1N1 clásico y H3N2 circulantes en ese momento en las poblaciones porcícolas, situación que también es evidenciada en Norte y Suramérica (Barrero, *et al.,* 2011; WHO, 2009b).

En los análisis de los alineamientos de los virus de Influenza porcina, la tasa de transiciones fueron mucho más frecuentes que la tasas de transversiones, aparentemente porque provocan una menor desorganización del genoma y por ello son menos reconocidas como errores y en consecuencia conllevan una probabilidad menor de ser corregidas (Topal y Fresco, 1976). En promedio para este estudio el porcentaje de transiciones para los genes HA y NA fue de 74.7% y 74.5% respectivamente, en comparación con las trasversiones que fueron del 25% y 12,5% para los genes que codifican para la HA, y NA respectivamente. Pese a esto, las variaciones encontradas en los genes HA y NA de los subtipos H1N1 pandémico y clásicos, son en su mayoría mutaciones sinónimas, que no provocaron cambios en la proteína y que pueden ser atribuidos a la deriva genética propia de los procesos replicativos del virus; sin embargo, se sabe ahora que incluso las mutaciones sinónimas no siempre son neutras, y aunque estas no pueden afectar la sucesión de la proteína directamente, si pueden afectar la estabilidad y arquitectura del ARN, la velocidad de traducción y el plegamiento de la proteína (Carter y Sanford, 2012)..

Los cambios que se encuentran entre las secuencias de los virus de influenza porcina, son el resultado de la acumulación continua de sustituciones de nucleótidos en el tiempo (Scholtissek, 1995; Worobey *et al.,* 2014), que sugieren la existencia de diversidad y pueden ser interpretados como las derivas genéticas de los virus circulantes en las granjas de cerdos (Rekik, *et al.,* 1994), lo cual es evidenciado en los virus de influenza porcina analizados en este estudio, donde hay diferencias entre cepas provenientes de diferentes, años en que fueron tomadas e incluso entre virus de la misma procedencia y año. Además, dado que las proteínas HA y NA juegan un papel fundamental en la capacidad del virus de infectar la célula y de liberar los nuevos virus que se producen (Neumann *et al*., 2009), se estima que sus genes pasan por un proceso de selección natural positiva que permite la sobrevivencia y evolución del virus (Uhlendorff *et al.*, 2009) y son producto de las variaciones de nucleótidos dentro de segmentos determinados del gen (Han, *et al.,* 2011), como ocurre en los análisis donde la mayoría de estos cambios se evidencian en el péptido de unión al receptor para el gen HA pero que no cumplen el mismo patrón en el gen NA donde se mantiene más conservada la proteína. No obstante, el principal determinante de la variación en las tasas de sustitución entre los virus de influenza parece ser la fuerza de presión de selección inmune, o sea las mutaciones que permiten escapar de la respuesta inmune y que también mantienen la estabilidad y función de las proteínas (San Juan, *et al.* 2005; De Visser, *et al.,* 2007), lo que sería interesante seguir estudiando respecto a los cambios encontrados en los virus de Influenza porcina Colombianos que no han sido reportados en la literatura.

3.2 Objetivo 2. Determinar los posibles cambios en las secuencias de los genes HA y NA de los virus de influenza porcina que tengan relevancia evolutiva basada en la literatura científica

3.2.1 Cambios en las secuencias del gen HA de los virus de Influenza porcina Colombianos con relevancia evolutiva

Los análisis de las secuencias de los virus de influenza porcina Colombianos para los subtipos H1N1 pandémicos y H1N1 clásicos, evidenciaron cambios a lo largo de la secuencia, principalmente en los nucleótidos que codifican para el péptido de unión al receptor, en los cuales se presentan los principales cambios antigénicos de la proteína, sin embargo, la mayoría de esas variaciones en la secuencia de aminoácido son sinónimas y no todas la variaciones encontradas en este análisis que produjeron un cambio de aminoácido, están reportados como sustituciones capaces de afectar la antigenicidad de la proteína (Anexo 7-3).

La respuesta inmune del huésped al virus de influenza involucra anticuerpos con actividad neutralizante alta que reconocen los epítopes en los sitios antigénicos de HA1; por tanto la capacidad de eludir estos anticuerpos del huésped se hace a través de la acumulación de mutaciones en las secuencias de nucleótidos, que causen el cambio de los aminoácidos de los sitios antigénicos de la HA, principalmente en el péptido de reconocimiento del receptor, provocando "deriva antigénica" del agente que con el tiempo hace que las propiedades antigénicas propias de esta proteína cambien y como resultado de las sustituciones de aminoácidos, se produzcan cambios en la capacidad de los anticuerpos para neutralizar el virus, bien sea a través de la interferencia de la unión del anticuerpo o cambiando algunas

propiedades asociadas como la unión al receptor; esta capacidad de cambio, es lo que representa el principal desafío en el diseño de vacunas (Shehel y Wiley, 2000; Soundararajan, *et al.,* 2011).

De acuerdo a lo reportado por la literatura las posiciones en la proteína del gen HA que tienen importancia evolutiva, se encuentran asociadas principalmente a aquellas relacionadas con el aumento o la disminución de la avidez por la unión a los tipos de receptores presentes en la célula huésped; para los virus de Influenza porcina H1N1 pandémico Colombianos se encontraron 14 posiciones, de acuerdo a lo reportado por la literatura, dentro de la proteína HA1, las cuales fueron analizadas junto a una cepa de referencia del virus de Influenza A H1N1 pandémico A/California/04/2009 Gb: ACP41107.1 Reportado por Dawood y col (2009).

Tabla 3-11: Posiciones en la proteína HA1 de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémico Colombianos de importancia evolutiva.

VIRUS	HA1													
	133	137	138	159	186	188	190	194	200	219	225	226	227	228
A/California/04/2009(H1N1)	K	A	A	N	S	S	D	L	T	I	D	Q	E	G
A/Swine/Colombia/0201(2009)	K	A	A	N	S	S	D	L	A	I	D	R	E	G
A/Swine/Colombia/0301(2009)	K	A	A	N	S	S	D	L	A	I	D	R	E	G
A/Swine/Colombia/1002(2009)	K	A	A	N	P	S	D	L	A	I	D	Q	E	G
A/Swine/Colombia/1101(2009)	K	A	A	N	S	S	D	L	A	I	D	Q	E	G
A/Swine/Colombia/1503(2010)	K	A	A	N	S	S	D	L	A	I	D	Q	E	G

A/Swine/Colombia/1(2011)	K	A	A	N	S	S	D	L	A	I	D	Q	E	G
A/Swine/Colombia/2(2011)	K	A	A	N	S	S	D	L	A	I	D	Q	E	G
A/Swine/Colombia/3(2011)	K	A	A	N	S	T	D	L	A	I	D	Q	E	G
A/Swine/Colombia/4(2011)	K	A	A	N	S	T	D	L	A	I	D	Q	E	G

Con respecto a los virus de influenza clásica para el gen HA, los cambios de las proteínas para el virus A/Swine/Colombia/0801/2008, comparadas con las secuencias de los virus A/swine/Colombia/0401/2008 Gb: AFU83122.1, publicado por Ramírez-Nieto y col (2012) y A/swine/USA/1976-MA/1931(H1N1) Gb: ACV52112.1 (Spiro, *et al.,* 2009), y la cepa de referencia correspondiente al virus de influenza porcina del subtipo H1N1 clásica, ubicando las mismas posiciones con importancia evolutiva reportadas por la literatura, se evidencian en la tabla 3-12.

Tabla 3-12: Posiciones en la proteína HA1 de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 clásico Colombiano de importancia evolutiva.

VIRUS	HA1													
	133	137	138	159	186	188	190	194	200	219	225	226	227	228
A/Swine/Colombia/0801(2008)	K	A	A	N	P	S	D	L	A	A	G	Q	A	G
A/swine/Colombia/0401/2008(H1N1)	K	A	A	N	P	S	D	L	A	A	G	Q	A	G
A/swine/USA/1976-MA/1931(H1N1)	K	A	A	N	P	S	D	L	A	A	G	Q	A	G

De las tres mutaciones en la proteína HA1 asociadas con el aumento en la afinidad para el cambio de preferencia de unión al receptor de ácido siálico de α2,6 a α2,3 (N159D, Q226R y D225G), se evidenció solo el cambio Q226R, en los virus de influenza porcina

pandémicos Colombianos A/Swine/Colombia/0201/2009 y A/Swine/Colombia/0301/2009 provenientes de cerdos de preceba y ceba de la región Antioqueña, lo que define que estos virus podrían tener una mayor afinidad por la unión al receptor de ácido siálico del tipo α2,6 lo que concuerda con el hecho de que en estos virus pandémicos la HA proviene de humanos. Por su parte, la mutación D225G, se evidenció en los virus de influenza porcina clásicos Colombianos, lo que indica que estos podrían tener más afinidad de unión a los enlaces α2,3, lo que resulta consecuente con el hecho de que este subtipo, evolucionó directamente del virus de Influenza Aviar (He, *et al.,* 2014; Zhang, *et al.,* 2013, Zhao, *et al.,* 2012; Xu, *et al.,* 2012)**.**

De acuerdo con el análisis, se encontraron los siguientes aminoácidos en las posiciones A138, L194 y G228 en todos los virus de Influenza porcina colombianos en la proteína HA1, las cuales son altamente conservadas en los virus de influenza aviar (Nam, *et al.,* 2011) y son caracterizados por tener afinidad de unión al receptor de ácido sialico del tipo α2, 3Gal (Rogers et al., 1983; Goh et al., 2009), lo cual corresponde con el origen de los virus de Influenza porcina subtipo H1N1, que provienen del virus de influenza aviar (Morens, *et al.,* 2009). Por su parte, la posición E190 fue sustituida por una D (ácido aspártico) en todos los virus de influenza porcina colombianos analizados, lo cual puede indicar una pérdida por la afinidad de unión al receptor α2,3 que puede implicar una disminución en la capacidad del virus para infectar y replicar en células hospederas con este tipo de receptor, principalmente a las aves (Pekosz, *et al.,* 2000).

La presencia de dos cambios S186P y S188T, que demuestran un aumento por la avidez de unión al receptor del tipo α2,3 (Das, *et al.,* 2011); fue evidenciada en el presente estudio donde se encontró la mutación S186P en los virus de influenza porcina clásica colombianos y en el virus de influenza porcina pandémica A/Swine/Colombia/1002/2009 y la mutación S188T se observó en dos virus de influenza porcina del subtipo H1N1 pandémico de la región de los Llanos Orientales (A/Swine/Colombia/3/2011 y A/Swine/Colombia/4/2011), indicando la posible preferencia de estos virus por la unión a receptores del tipo α2,3 lo que indica que podrían ser transmitidos con mayor facilidad a las aves; por el contrario, de las mutaciones asociadas a la disminución en la avidez de unión al receptor α2,3 A137T y A200T, solo A200T se evidenció en el virus de influenza pandémico de referencia A/California/04/2009 proveniente de humano (De Vries, *et al.,* 2013).

Las combinaciones reportadas en las posiciones puntuales que intervienen con la especificidad y avidez al receptor según el huésped son: D190 / D225 o E225 para los receptores de tipo α2,6 en los seres humanos, D190 / G225 para los receptores que se unen a α2,6 y α 2,3 en cerdos y E190 / G225 para los receptores de tipo aviar (Shen, *et al.,* 2009; Shi, *et al.,* 2014). Los virus que poseen la combinación de la mutación D225G y E190D, para este estudio corresponden a los virus de influenza porcina del subtipo H1N1 clásicos, lo que supone que estos agentes pueden tener especificidad de unión al receptor dual; estas variaciones en la especificidad de unión al receptor se han tratado de explicar por cambios conformacionales que sufre la proteína que hace que se relaje el bucle 220 y permite al residuo Q226 interactuar con el receptor SA α2,3-ligado (Xu, *et al.,* 2012). Por el contrario, los virus de influenza porcina del subtipo H1N1 pandémico

Colombianos, presentaron la combinación D190/D225, que indica la posible preferencia por el unión al receptor humano del tipo α2, 6.

En los virus de influenza porcina subtipo H1N1 clásico, se presenta una región altamente conservada en las posiciones A200 y A227, las cuales son evidenciadas en este estudio, y también son conservadas en virus de influenza aviar (De Vries, *et al.,* 2010), sin embargo en los virus de influenza pandémica se sustituye A227 por Glu227 (E227) y concuerda con lo encontrado en este estudio; por su parte, el aminoácido Ile219 (I219) es altamente conservado en los virus de influenza porcina pandémicos, mientras que en los virus de influenza porcina clásicos se evidencia Ala219 (A219) (Xu, *et al.,* 2012), lo cual está de acuerdo con los cambios encontrados en el análisis de los virus objeto de este estudio.

Maines y col (2009) sugieren que la presencia de E227 combinado con I219 en las proteínas HA1 de los virus pandémicos interrumpe los contactos óptimos de la proteína con los glicanos del receptor α2-6. La sustitución E227A interrumpe la interacción potencial entre los enlace de hidrógeno con la penúltima galactosa del ácido siálico, y esta pérdida del enlace de hidrógeno puede afectar las interacciones dinámicas entre receptor y el sitio de unión al receptor de la proteína HA1 cambiando de este modo la afinidad de unión del receptor. El cambio en la afinidad de unión al receptor de ácido siálico α2,6Gal a receptor de ácido siálico α2,3Gal, se cree ocurre para alterar la especificidad de unión al receptor viral durante la adaptación de los virus aviares a los seres humanos y a los cerdos para que de esta manera se impida la re-transmisión a las

aves y así se mantenga la patogenicidad en los mamíferos (Gambaryan, *et al.,* 2005; Tumpey, *et al.,* 2007; Garten, *et al.,* 2009; Neumann, *et al.,* 2009; Arias, *et al.,* 2009).

Las mutaciones representadas por los cambios en las secuencias de aminoácidos, están de acuerdo con un modelo reciente de la deriva antigénica, en el que los mutantes del virus de influenza A alternan la alta y baja avidez para la unión al receptor en respuesta a procesos adaptativos o de evasión de la respuesta inmune adaptativa (De Vries, *et al.,* 2013). Sin embargo, en los virus de influenza porcina del subtipo H1N1 pandémico colombianos, no se han observado grandes cambios antigénicos hasta ahora, aún cuando se ha descrito una alta tasa de evolución para el virus de influenza porcina del subtipo H1N1 pandémico de 3.66×10^{-3} sustituciones/sitio/año (Smith, *et al.,* 2009) y posee una tasa de cambio para el segmento de HA de 0,9 × 10-3 sustituciones / sitio / año que representa la más baja de toda las variabilidades virales del subtipo H1N1 estacional (1918-1957 = $2,9 \times 10^{-3}$, 1977-2009 ; $1,7 \times 10^{-3}$, y H1 porcina 1930-2009; $1,9 \times 10^{-3}$) (Furuse, *et al.,* 2010, Graham, *et al.,* 2011), sin embargo se puede inferir que basados en los resultados, los virus de influenza porcinos del subtipo H1N1 colombianos, se mantienen estables y no cursan severos procesos de adaptación, ni debe cambiar drásticamente para evadir la respuesta inmune, principalmente debido a la ausencia de aplicación de vacunas.

3.2.2 Cambios en las secuencias del gen NA de los virus de Influenza porcina Colombianos con relevancia evolutiva

Debido al papel crítico de la proteína NA en la replicación viral y sus sitios activos altamente conservados, NA es el principal objetivo para el diseño de fármacos contra el

virus de influenza, por tanto, las mutaciones en la secuencia de la proteína NA, pueden traer como consecuencia la resistencia a drogas antivirales cuando se presentan mutaciones en posiciones puntuales de la proteína.

Para todos los subtipos del virus de influenza, existe el potencial de que el virus se vuelva resistente a los adamantanos o a los inhibidores de la NA por una mutación, que se da por lo general en respuesta al tratamiento con fármacos. Las presiones selectivas positivas causadas por la profilaxis contra el virus, no se producen entre las aves acuáticas silvestres o en cerdos, por lo que la adquisición de estas resistencias puede ocurrir como resultado de la adquisición aleatoria de mutaciones específicas en NA que reducen la susceptibilidad o incluso conducen a la resistencia; también esa resistencia podría ocurrir a través de recombinación génica con virus humanos y de cerdos portadores de mutaciones que confieran resistecia a los fármacos (Stoner, *et al.,* 2010)

De acuerdo a lo reportado por la literatura, las posiciones en la proteína codificada por el gen NA que tienen importancia evolutiva, (Tabla 3-13), para los virus de Influenza porcina del tipo H1N1 pandémico Colombianos, fueron comparadass frente con las de una cepa de referencia del virus de Influenza A del tipo H1N1 pandémico A/California/04/2009 Gb: ACP41107.1 Reportado por Dawood y col (2009) (Tabla 3-13). Las comparaciones de la variabilidad del gen NA del virus A/Swine/Colombia/0801/2008 se hizo con la secuencia del virus A/swine/USA/1976/1931(H1N1) Gb: ACV52115.1 (Spiro, *et al.,* 2009) y A/Swine/Guangdong/L372009 Gb: ADW01465.1 (Kong, *et al.,* 2011) correspondientes a virus de influenza porcina del tipo H1N1 clásica (Tabla 3-14).

Tabla 3-13: Posiciones en la proteína NA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 pandémicos Colombianos de importancia evolutiva.

VIRUS	NA															
	51	106	119	130	136	150	152	223	239	248	252	274	275	292	294	295
A/California/04/2009(H1N1)	Q	V	E	R	Q	K	R	I	F	N	S	Y	H	C	D	N
A/Swine/Colombia/0201(2009)	Q	I	E	R	Q	K	R	I	F	D	S	Y	H	C	D	N
A/Swine/Colombia/0301(2009)	Q	I	E	R	Q	K	R	I	F	D	S	Y	H	C	D	N
A/Swine/Colombia/1002(2009)	Q	I	E	R	Q	K	R	I	F	D	S	Y	H	C	D	N
A/Swine/Colombia/1101(2009)	Q	I	E	R	Q	K	R	I	F	D	S	Y	H	C	D	N
A/Swine/Colombia/1503(2010)	Q	I	E	R	Q	K	R	I	F	D	S	Y	H	C	D	N
A/Swine/Colombia/1(2011)	Q	I	E	R	Q	K	R	I	F	D	S	Y	H	C	D	N
A/Swine/Colombia/2(2011)	Q	I	E	R	Q	K	R	I	F	D	S	Y	H	C	D	N
A/Swine/Colombia/3(2011)	Q	I	E	R	Q	K	R	I	F	D	S	Y	H	C	D	N
A/Swine/Colombia/4(2011)	Q	I	E	R	Q	K	R	I	F	D	S	Y	H	C	D	N

Tabla 3-14: Posiciones en la proteína NA de los virus de Influenza Porcina subtipo H1N1 clásicos Colombianos de importancia evolutiva.

VIRUS	NA															
	51	106	119	130	136	150	152	223	239	248	252	274	275	292	294	295
A/Swine/Colombia/0801(2008)	Q	I	E	R	Q	K	R	I	F	N	S	Y	H	C	D	N
A/Swine/Guangdong/L3/2009(H1N1)	Q	I	E	R	Q	K	R	I	F	N	S	Y	H	C	D	N
A/swine/USA/1976-MA/1931(H1N1)	Q	I	E	R	Q	K	R	I	F	N	S	Y	H	C	D	N

Dentro de las variaciones en las secuencias de la proteína NA de los virus de influenza porcina, existen 3 grupos de mutaciones que son evidenciados en los virus de influenza

porcina del tipo H1N1 pandémico: 1. V106 y N248, 2. I106 y N248, y 3. I106 y D248. Estas variaciones se organizan por grupo también en los virus estudiados, 1. V106 y N248 para el virus de referencia A/California/04/2009, 2. I106 y N248 para el virus de influenza porcina del tipo H1N1 clásico A/Swine/Colombia/0801/2008 y 3. I106 y D248 para los virus de influenza porcina del subtipo H1N1 pandémicos. De estos cambios, se destaca la variación genética rápida de este antígeno de superficie bajo la presión inmune del huésped (Hu, 2010).

En todas las secuencias de los virus de influenza porcina del tipo H1N1 pandémico y H1N1 clásico se evidenciaron los aminoácidos en posiciones 119(E), 152(R), 275(H), 295(N) y 239(F) de las proteínas del gen NA, indicando que estos virus son posiblemente sensibles a los inhibidores de la Neuraminidasa como el Oseltamivir fosfato (Scholtissek et al., 1998; Suzuki et al., 2003; Achenbach y Bowen, 2013). En los virus Colombianos analizados no se encontraron mutaciones de NA, como E119G y E119V, las cuales confieren resistencia a múltiples fármacos (Pizzorno, *et al.,* 2011).

Entre las variaciones de la proteína NA que confieren resistencia a los inhibidores de la Neuraminidasa se encuentran R152 y E119 (Brown, 2000), los cuales estuvieron presentes en todos los virus de influenza porcina Colombianos analizados; en el caso de, el aminoácido R292, que también se relaciona con resistencia a inhibidores de la neuraminidasa, se encontró un cambio a C292, el cual no ha sido reportado como mutación que confiera resistencia. Las mutaciones que contribuyen a la resistencia al antiviral Zanamivir H275Y (Oh y Hurt, 2014) y resistencia a Oseltamivir N294S, no se encontraron en las secuencias de aminoácidos de las proteínas de los virus porcinos del

tipo H1N1 pandémicos ni en los del tipo H1N1 clásicos, por tanto se considera que estos virus son sensibles al Zanamivir, sin embargo se evidencia un cambio en la posición D294 la cual no se ha reportado como causal de resistencia a Oseltamivir (Arias, *et al.,* 2009, Ginting *et al.,* 2012). Lo anterior es importante ya que es necesario evaluar el posible efecto que estos cambios, a nivel de la secuencias de aminoácidos, puedan tener en la resistencia y/o susceptibilidad del virus a diferentes fármacos, debido a la capacidad que tiene el virus de saltar la barrera del huésped y transmitirse a humanos, donde se requiere el uso de estos inhibidores para el control de la enfermedad, por lo que hace importante evaluar si esta mutación se asocia a resistencia.

Otras mutaciones que confieren un alto grado de resistencia al zanamivir, como Q136K en la proteína NA del virus de influenza H1N1 pandémico 2009 (Kaminski, *et al.,* 2012, Oh y Hurt, 2014), no se encontraron en ninguno de los virus de influenza porcina del tipo H1N1 pandémicos, al igual que otras de las posiciones donde la mutación provocaría resistencia al oseltamivir como K150T y I223R (Wiley et al., 1981; Harder et al., 2013, Chiapponi, *et al.,* 2014)

.

Las infecciones pueden aparecer en una población de cerdos si un virus se recombina con un subtipo ya bien adaptado para producir un virus reagrupado con una mejor condición física y / o características antigénicas distintas (Lange *et al*., 2013) Para el caso de los virus de influenza porcina evaluados, esos cambios se encuentran representados principalmente en el cambio de receptor de la proteína para mantenerse afectando solo a la población susceptible, en este caso mamíferos (humanos y cerdos), pero al parecer no se asocian con una resistencia a antivirales sin embargo, se hace importante determinar el potencial que pueden tener estos cambios en la evolución del virus, principalmente aquellos que no han sido evaluados ni reportados previamente en la literatura.

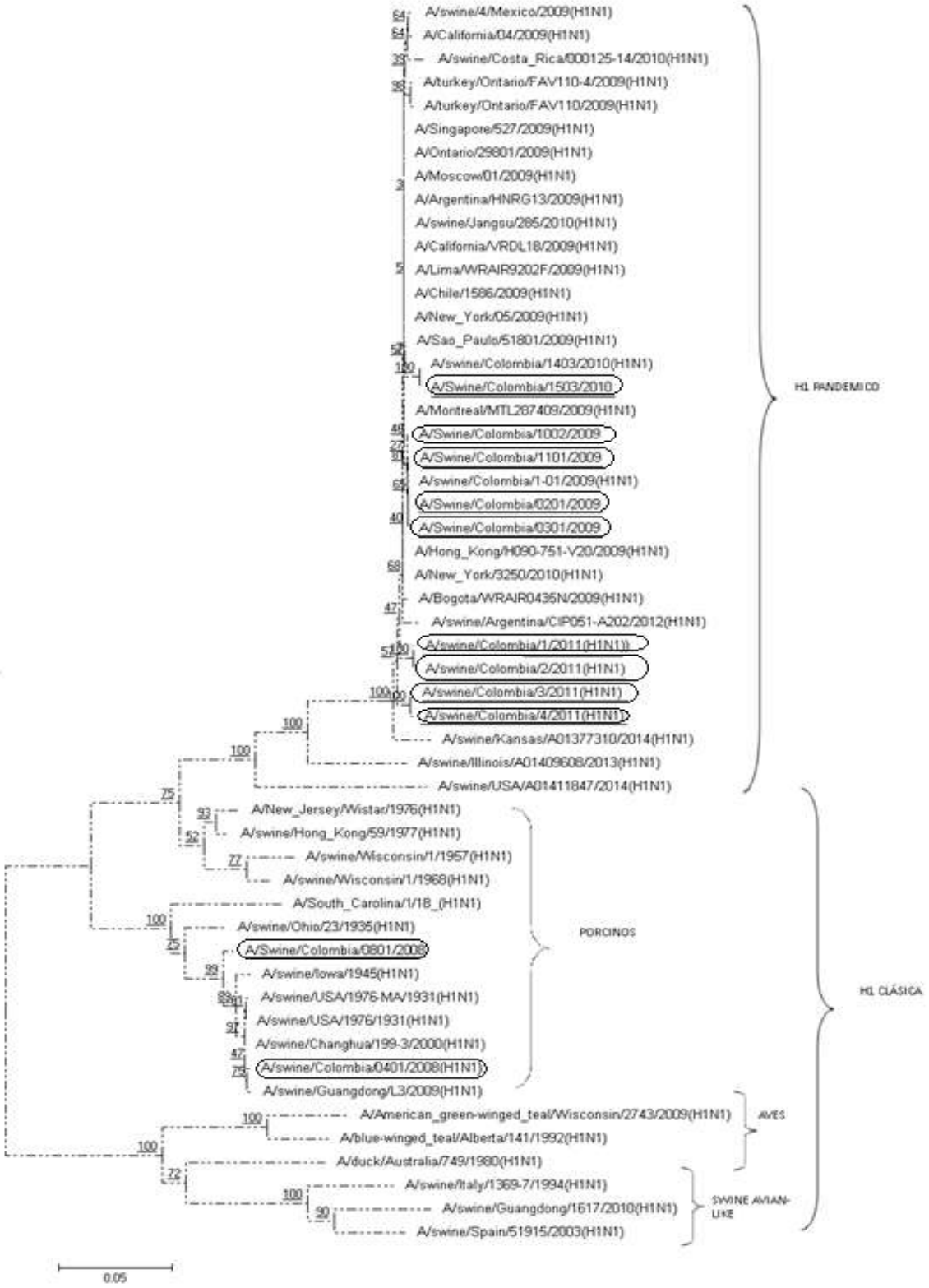
3.3 Objetivo 3. Establecer las relaciones filogenéticas de los virus de influenza porcina reportados en Colombia con la información encontrada en el Genbank y con los virus porcinos reportados en otras partes del mundo

3.5 Análisis Filogenético

Los árboles filogenéticos de los genes HA y NA (figuras 3-5 y 3-6), muestran claramente que los virus de influenza porcina analizados en este estudio y que fueron aislados de cerdos procedentes de las zonas de mayor producción porcícola del país, se encontraron distribuidos en dos grupos: virus de influenza porcina del tipo H1N1 pandémico y virus de influenza porcina del tipo H1N1 clásica. En las partes superiores de ambos árboles filogenéticos se encuentran los virus pandémicos aislados durante el periodo de tiempo correspondiente a los años 2009 a 2011, en el cual se encuentran agrupados los aislados colombianos junto a otros virus humanos y porcinos del subtipo H1N1p, incluyendo al virus A/Swine/California/04/2009 aislado de humano y considerado el origen de la pandemia por virus de influenza del tipo H1N1 del 2009. Este virus de referencia muestra una identidad del 99%, con todos los virus de influenza aislados de la región de los Llanos Orientales, Antioquia, Valle y Centro del país. Los porcentajes de identidad para el gen HA, entre los 9 virus de influenza porcina H1N1 pandémicos aislados fue del 99-100%, mostrando un 100% de identidad entre los virus provenientes de los Llanos Orientales,, un 99% de identidad entre los virus provenientes de Antioquia y para el virus A/swine/Colombia/1002/2009 (pH1N1) de la región del Valle del Cauca, una identidad del 99% con respecto a los demás.

Los análisis del gen HA de los aislamientos de virus de influenza porcina del tipo H1N1 pandémico , muestran que los virus colombianos están filogenéticamente relacionados con virus provenientes de humanos en USA, Argentina, Chile, Perú Canadá y Brasil y con virus porcinos originados principalmente en Norte América y Asia. El aislamiento A/swine/Colombia/1503/2010 presentó un 99% de identidad y menor número de nucleótidos de diferencia con las cepas de Sur América, para este caso con el virus de Brasil A/Sao_Paulo/51801/2009(H1N1), con el que está agrupado en un subgrupo de los virus pandémicos con solo 3 nucleótidos de diferencia.

Figura. 3-5: Relaciones evolutivas del gen HA de los virus de influenza porcina



Las relaciones evolutivas fueron inferidas usando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Se observa el árbol mas óptimo con una longitud de ramas total de 1.60298787. El porcentaje de réplicas de árboles con un bootstrap de 1000 réplicas, se muestra seguido de las ramas (Felsenstein, 1985) El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computarizadas usando el método de Kimura 2-parameter (Kimura, 1980) y se encuentran en las unidades de la cantidad de base de sustituciones por sitio. La tasa de variación entre sitios fue modelada con una distribución gamma (parámetro de forma = 4). El análisis incluyó 51 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contienen gaps y los datos faltantes fueron eliminados. Un total de 1.659 caracteres formó el conjunto de datos analizados. El análisis evolutivo se realizó en MEGA6 (Tamura, *et al.,* 2013).

Los virus de influenza porcina provenientes de los Llanos Orientales correspondientes al año 2011, se encuentran asociados a las cepas de los virus de influenza porcina del tipo H1N1 pandémica de 2012 de Argentina y del 2014 de USA, correspondientes a virus de influenza porcina aislados de cerdos, con quienes se evidenció una identidad del 99% y una diferencia de 4 y 5 nucleótidos, respectivamente.

En relación a los virus de influenza porcina del subtipo H1N1 clásico, se muestran 2 clúster conformados por los virus de influenza porcina, virus de influenza de Aves y virus de porcino (swine avian-like). El virus A/swine/Colombia/080**1**/2008 (H1N1 clásico) y A/swine/Colombia/0401/2008 (Ramirez-Nieto, *et al.,* 2012) se agrupan en el segundo

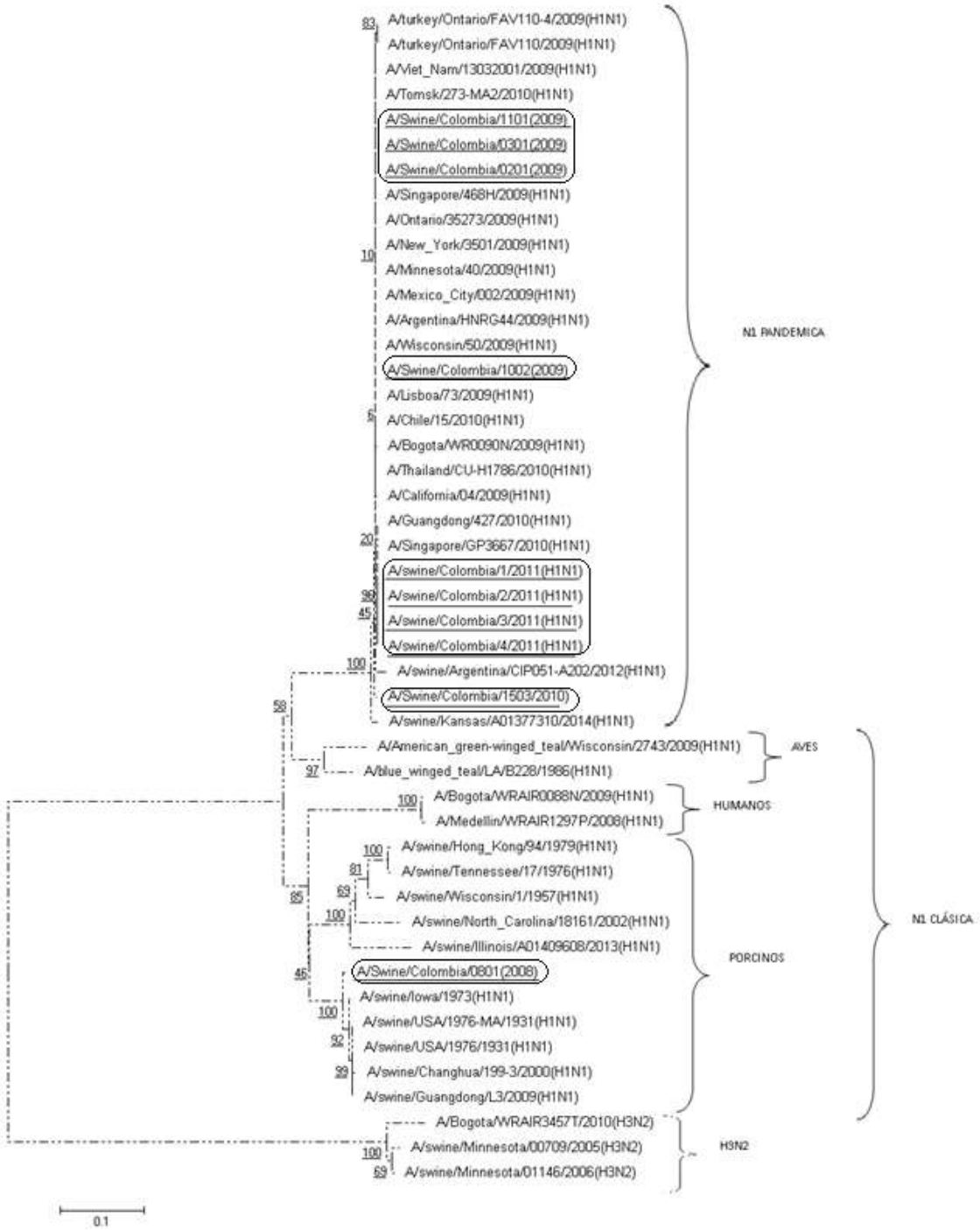
cluster, en un subgrupo donde se encuentran virus H1N1 clásicos aislados de USA de 1931-1945 y de Asia, Changhua, 2000 and Guandong (China) 2009, con un porcentaje de identidad de 99% entre las secuencias de nucleótidos. Los otros subgrupos de H1N1c incluyen representantes de los virus porcinos de los años 1957 a 1977, de origen Asiático y Norteameriano. Interesantemente, el homólogo más cercano del virus A/swine/Colombia/0801/2008 es el virus A/swine/Iowa/1945 con solo 5 nucleótidos de diferencia. Aún con una identidad del 99% y siendo aislados de la misma procedencia y durante el mismo año, la diferencia entre estas dos cepas Colombianas de Influenza H1N1 clásica es de 10 nucleótidos con el virus A/swine/Colombia/0401/2008, el cual a su vez se encuentra más cercano con el virus de influenza porcina del tipo H1N1 clásica de Changhua (Ramirez-Nieto¸*et al.,* 2012).

En cuanto al análisis filogenético de los virus con respecto al gen NA (Figura 3-6), se encontró que están agrupados en un subgrupo del clado de los virus pandémicos con el menor número de diferencias de nucleótidos, a los virus procedentes de los Llanos Orientales y al virus aislado de la región central A/Swine/Colombia/1503/2010, los cuales mostraron una identidad del 99%, y una mínima diferencia de 4 nucleótidos con el virus A/Swine/Colombia/1/2011; en este grupo también se encuentran virus de Singapur y Guangdong del 2010 procedentes de humanos y dos cepas de virus de influenza porcina del subtipo H1N1 pandémico aisladas de cerdos de Argentina en el 2012 y de Kansas en el 2014 con los cuales el virus A/Swine/Colombia/1503/2010, mostró una identidad del 98% y 7 nucleótidos de diferencia en promedio. Con respecto a la relación entre los virus

de los Llanos Orientales y de la región occidental (Antioquia y Valle), los virus A/Swine/Colombia/0201/2009,A/Swine/Colombia/0301/2009, A/Swine/Colombia/1002/2009 y A/Swine/Colombia/1101/2009 del año 2009, evidencian mayor número de cambios en los nucleótidos y una mayor distancia en el árbol, sin embargo, entre los virus procedentes de Antioquia, A/Swine/Colombia/0201/2009, A/Swine/Colombia/0301/2009 y A/Swine/Colombia/1101/2009 no se encontraron diferencias en el número de nucleótidos y tienen una identidad del 100%, agrupándose con virus de influenza del tipo H1N1p aislados de humanos de Rusia, Vietnam, Singapur, USA. Con respecto al virus A/Swine/Colombia/1002/2009, procedente del Valle del Cauca, este se relaciona filogenéticamente más con virus aislados de humanos de las regiones de Nuevo México, Argentina, USA y Lisboa con identidades del 99% y solo 2 nucleótidos de diferencia entre ellos.

En cuanto a la clasificación de los virus de influenza porcina del tipo H1N1 clásica dentro del árbol filogenético del gen NA, se dividió en un cluster, dividido a su vez en 3 subgrupos, en los cuales el virus A/Swine/Colombia/0801/2008 se encuentran en el tercero mostrando relaciones filogenéticas similares con virus aislados de cerdos de USA (1931 y 1973) y de Asia, Changhua, (2000) y Guandong (China) 2009, con un 98,5% de identidad, pero presentando las mínimas diferencias entre nucleótidos con el virus A/swine/Iowa/1973(H1N1), con el cual no hubo relación para el gen HA.

Figura 3-6: Relaciones evolutivas del gen NA de los virus de influenza porcina Colombianos



Las relaciones evolutivas fueron inferidas usando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Se observa el árbol mas óptimo con una longitud de ramas total de 1.50523708. El porcentaje de réplicas de árboles con un bootstrap de 1000 réplicas, se muestra seguido de las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computarizadas usando el método de Kimura 2-parameter (Kimura, 1980) y se encuentran en las unidades de la cantidad de base de sustituciones por sitio. La tasa de variación entre sitios fue modelada con una distribución gamma (parámetro de forma = 4). El análisis incluyó 53 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contienen gaps y los datos faltantes fueron eliminados. Un total de 1346 caracteres formó el conjunto de datos analizados. El análisis evolutivo se realizó en MEGA6 (Tamura, *et al.,* 2013).

De acuerdo con la información disponible anteriormente en Colombia sobre la presencia del virus de influenza en porcinos, se sabe que los serotipos H1N1 y H3N2 circularon en el país desde antes del 2009 **(**Hanssen, *et al*., 1977; Moscoso y Neira, 2001; Mogollón, *et al.,* 2003; Cucaita, 2005; Jaime *et al.*, 2011) y como consecuencia no es sorprendente que los aislamientos de 2008 fueran del virus de influenza porcina del subtipo H1N1 clásica. Sin embargo, se evidencia el predominio de virus de influenza porcina del subtipo H1N1 pandémico aislados entre 2009 y 2011, y por PCR en tiempo real, también se sigue evidenciando la presencia del virus en las muestras de fluido oral recolectadas en los años 2012 a 2013, pertenecientes al subtipo H1N1 pandémico. Sin embargo, durante ninguno de los años muestreados se aisló o identificó por técnicas moleculares el subtipo H3N2, aún cuando los registros serológicos evidencian su circulación en las granjas

porcícolas del país. Los cambios en los subtipos circulantes en los cerdos del país, sugiere que un nuevo virus de influenza porcina como el H1N1 pandémico, con características genéticas diferentes a las del subtipo H1N1 clásico, fue capaz de entrar e infectar a un número de animales susceptibles, desplazando a los virus que circulaban previamente en las granjas hasta 2009; por lo tanto, un gran número de animales susceptibles fueron infectados con un nuevo subtipo, frente al cual no existía respuesta inmune previa; además, debido a que en las poblaciones porcícolas de Colombia no existen programas de vacunación frente al virus de influenza A, no hay establecida una inmunización en las granjas frente a los desafíos de campo, lo que conlleva a la reducción de presión inmune, lo cual permitió la entrada del nuevo virus en la población y su expansión a lo largo del territorio (Ramirez-Nieto, *et al.,* 2012).

Al comparar los aislamientos de los virus de influenza porcina para el gen HA, se encontró una homología de 99% entre los virus colombianos aislados en el año 2009, y una homología de 100% entre los virus de influenza porcina aislados en el 2011 en los Llanos Orientales Colombianos; al comparar los virus de influenza porcina del subtipo H1N1 pandémicos de los años 2009, 2010 y 2011 se evidencia una variación en un mayor número de nucleótidos, sugiriendo que este gen en el virus está cambiando rápidamente; lo cual es diferente a los resultados encontrados al comparar los mismos virus para el gen NA, que por el contrario muestra una baja variación entre los virus de influenza porcina aislados entre los años 2009 a 2011; esto se debe al hecho de que no se han presentado retos para evadir la barrera inmunológica por la falta de vacunación y

a que no se realizan controles profilácticos que lleven a la mutación del gen NA en respuesta al uso de inhibidores de la Neuraminidasa en la industria porcícola del país.

Los genes NA y HA del virus de influenza porcina subtipo H1N1 clásico, muestran una mayor variabilidad genética, geográfica y temporal lo que se relaciona con el periodo de tiempo en el cual ha estado circulando el virus en el país, y puede explicase por el hecho de que estos cambios vienen de un proceso de adaptación que hace de este subtipo, un virus exitoso con la capacidad de sobrevivir y persistir independiente del tiempo y del espacio, sobreviviendo a la presión inmunológica permanente en la población, y una creciente gama de huéspedes susceptibles (Ma, *et al.,* 2009; Vincent, *et al.,* 2008), lo cual es evidenciado por el hecho de contar con información serológica desde hace 40 años, en los que su presencia fue constante, además de las diferencias encontradas entre los mismo virus a nivel de secuencia de nucleótido, aminoácidos y con respecto a las relaciones filogenéticas establecidas, lo que indica procesos de deriva genética incluso dentro de las mismas poblaciones susceptibles.

Debido a que la mayor parte del intercambio comercial en términos de animales vivos y el semen que realiza Colombia es con EE.UU, no es raro encontrar una estrecha relación entre los virus de influenza porcina aislados. Esto también sugiere que el origen de la entrada del virus de la influenza en el país data de hace bastantes años, pero el seguimiento del origen del animal en campo dificulta la capacidad de encontrar el origen de los virus circulantes (Ramirez-Nieto, *et al.,* 2012; Jaime, *et al.,* 2011). En cuanto a los aislamientos relacionados con virus de países Asiáticos, es más difícil establecer la relación o trayecto del virus que permitió dicha relación.

Además, teniendo en cuenta que virus de influenza porcina del tipo H3N2, y H1N1p están circulando en la población porcina en Colombia, de acuerdo a los registros serológicos, y de que existe la posibilidad de que nuevos virus, como el H1N2 que surgió en Italia (Moreno, *et al.,* 2011) como resultado de la recombinación entre el H3N2 y el virus de la influenza porcina H1N1 pandémico, puedan surgir en las explotaciones del país, es necesario mantener un monitoreo permanente del virus de influenza porcina en Colombia, más cuando se presentan seroprevalencias, pero no se conocen exactamente las características de los virus actuantes a nivel de campo, ejemplo típico el del virus del tipo H3N2. Además, debido a las condiciones tropicales del país que ofrecen un hábitat apropiado para un gran número de huéspedes y aves migratorias, además de la existencia la una agricultura extensiva y de explotaciones de traspatio, se crea un ambiente único en el que diversas especies de aves acuáticas migratorias están en contacto con caballos, cerdos y aves, así como una amplia gama de otros huéspedes susceptibles, se hace necesario establecer los aspectos relacionados con la epidemiología del virus, conociendo lo que está sucediendo en la evolución de los virus de la influenza porcina más allá de su diversidad genética hasta las poblaciones más susceptibles, con el fin de prevenir nuevas pandemias y/o epidemias de esta enfermedad y dilucidar el riesgo real que representan los cerdos y su potencial para ser transmisores de nuevos virus de influenza provenientes de los cerdos a los humanos en las condiciones propias de nuestro país..

4. Conclusiones

La influenza porcina es una enfermedad respiratoria aguda que participa activamente en el complejo respiratorio porcino y es responsable de muchas pérdidas económicas en las explotaciones a nivel mundial. La importancia de su estudio y control radica principalmente desde el punto de vista epidemiológico, ya que el cerdo es visto como riesgo potencial de diseminación del virus entre especies siendo denominado como vaso mezclador por poseer en el tracto respiratorio superior los dos tipos de enlaces (α2,3-galactosa y α2,6-galactosa) que sirven como receptores celulares específicos para los virus de influenza, indicando la susceptibilidad de esta especie a los virus de influenza aviar y humano; sumado a que la recomposición genómica de dichos virus frecuentemente emerge de los cerdos.

Los análisis de los virus de influenza porcina del subtipo H1N1 pandémico y clásico, evidenciaron variaciones a lo largo de los genes HA y NA, representados en variaciones en las secuencias de aminoácidos. Aunque la mayoría de las variaciones resultaron en mutaciones sinónimas, se presentó variabilidad en los aminoácidos encontrando cambios que no han sido reportados en la literatura, por lo que se hace necesario determinar si juegan algún papel en la antigenicidad de las proteínas involucradas.

La mayoría de las variaciones que tuvieron importancia evolutiva para el gen HA, pertenecen a nucleótidos que hacen parte de la región que codifica para el péptido HA1,

encargado del reconocimiento de receptores sobre la célula huésped, hasta donde esto pueda tener un impacto en la ampliación del rango de huéspedes susceptibles es un aspecto que amerita estudio adicional.

Los análisis en la secuencia de aminoácidos de la proteína traducida por el gen NA, no mostraron mutaciones asociadas a resistencia a antivirales, por el contrario se evidenció en las secuencias la presencia de todos los aminoácidos que confieren susceptibilidad a inhibidores de la Neuraminidasa, aspecto importante desde el punto de vista del establecimiento de medidas de tipo profiláctico.

Aún cuando las relaciones filogenéticas de los virus de influenza porcina Colombianos de los subtipos H1N1 pandémicos y clásicos se agruparon de acuerdo a lo esperado, no se pudo establecer los cambios ocurridos en el virus durante el periodo de 2012 a 2013, se recomienda por lo tanto continuar con estudios de este tipo que permitan hacer un seguimiento permanente para establecer la dinámica evolutiva de los virus de influenza porcina que circulan en Colombia.

La comprensión de la evolución de los virus de Influenza Porcina circulantes en Colombia, es esencial para el estudio de la diversificación y para la determinación de las relaciones genéticas y antigénicas entre las cepas que puedan permitir establecer programas de control contra la influenza porcina viables para la situación actual del país.

La determinación de las tasas de cambio evolutivo en los virus de la influenza porcina, estimadas en cambios a nivel de nucleótidos y aminoácidos, son fundamentales para

resolver muchas preguntas sobre la evolución del virus de la influenza porcina circulantes en el país y en el mundo, incluyendo aquellas relacionadas con selección natural, deriva genética y origen de los virus.

Los cambios en los nucleótidos de las proteínas de superficie, en relación con los cambios en los genes de las proteínas internas, suelen revelar diferencias en la evolución, siendo los cambios silenciosos en la proteína HA mucho mayores a los de las proteínas PB2, NP y M en una proporción de 81-96% frente a 57% (Webster, *et al*., 1992), sin embargo es necesario el análisis de todos los genes del virus, con el fin de aportar al conocimiento sobre el virus y la evolución molecular de los virus de influenza porcina en Colombia.

5. Perspectivas

El virus de influenza porcina es endémico en las poblaciones de cerdos de gran parte del mundo, y posee un comportamiento estacional, siendo las temporadas invernales, las que más favorecen su aparición y diseminación en las granjas.

La generación de nuevos virus por reordenamiento entre cepas del virus de influenza porcina, es inevitable. En este contexto la posibilidad de que una nueva cepa cause una epidemia o pandemia en poblaciones inmunológicamente susceptibles, representa un desafío para la salud poblacional.

El entendimiento de las variaciones y de la evolución de los virus de influenza porcina circulantes en una población, es de gran importancia para entender las características moleculares y tal vez poder utilizar algunos de estos virus como candidatos para ser utilizados como cepas vacunales, además esto puede ayudar a predecir y detectar las cepas de influenza que pudieran predominar en una población.

Los estudios de caracterización molecular del virus de influenza porcina, permiten un acercamiento al comportamiento del virus en las poblaciones productivas y puede convertirse en la herramienta para determinar la epidemiología de la enfermedad con el fin de tener información oportuna permanente que permita el desarrollo y/o evaluación de biológicos dirigidos al control de ésta enfermedad de relevancia tanto a nivel nacional

como internacional y que tiene implicaciones de gran impacto desde el punto de vista de salud pública.

Con respecto a las variaciones en la secuencia de las proteínas antigénicas, las cuales no se encontraron reportadas en la literatura, evidencian la necesidad de evaluar si estos cambios representan una ventaja evolutiva para los virus de Influenza Porcina Colombianos, los cuales varían en respuesta a la presión de las cepas de campo y evolucionan de manera diferente a aquellos expuestos a presión originada por el uso de vacunas.

Anexos:

Tabla 7-1: Variaciones en el gen HA entre los virus de influenza Porcina H1N1 pandémicos Colombianos.

VIRUS	POSICIÓN EN LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL GEN HA (1701pb LONGITUD TOTAL)																	
	21	22	42	43	141	179	183	201	210	233	267	273	288	295	324	340	389	423
A/Swine/Colombia/0201(2009)	T	C	C	A	T	A	A	G	T	T	A	C	T	A	C	G	G	C
A/Swine/Colombia/0301(2009)	T	C	C	A	T	A	A	G	T	T	A	C	T	A	C	G	G	C
A/Swine/Colombia/1002(2009)	T	C	C	G	T	A	A	A	T	T	A	C	T	A	C	G	G	C
A/Swine/Colombia/1101(2009)	T	C	C	A	T	A	A	G	T	T	A	C	T	A	C	G	G	C
A/Swine/Colombia/1503(2010)	T	C	C	G	T	A	A	G	A	T	A	C	G	T	C	G	A	T
A/Swine/Colombia/1(2011)	T	T	C	G	T	G	A	G	T	T	T	A	T	A	C	A	G	C
A/Swine/Colombia/2(2011)	T	T	C	G	T	G	A	G	T	T	T	A	T	A	C	A	G	C
A/Swine/Colombia/3(2011)	C	C	T	G	T	A	C	G	T	C	A	C	T	A	T	A	G	C
A/Swine/Colombia/4(2011)	C	C	T	G	G	A	C	G	T	T	A	C	T	A	T	A	G	C

VIRUS	POSICIÓN EN LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL GEN HA (1701pb LONGITUD TOTAL)															
	432	437	447	468	476	568	579	598	603	605	607	687	719	756	777	807
A/Swine/Colombia/0201(2009)	C	A	A	T	A	A	A	T	T	G	G	G	G	G	C	A
A/Swine/Colombia/0301(2009)	C	A	A	T	A	A	A	T	T	G	G	G	G	G	C	A
A/Swine/Colombia/1002(2009)	C	A	A	T	A	A	A	C	T	G	G	G	A	G	C	A
A/Swine/Colombia/1101(2009)	A	A	A	T	A	A	A	T	T	G	G	G	A	G	C	A
A/Swine/Colombia/1503(2010)	C	A	A	T	G	G	A	T	T	G	G	A	A	A	C	A
A/Swine/Colombia/1(2011)	C	G	G	C	A	G	A	T	C	G	A	G	A	G	T	A
A/Swine/Colombia/2(2011)	C	G	G	C	A	G	A	T	C	G	A	G	A	G	T	A
A/Swine/Colombia/3(2011)	C	A	A	T	A	G	G	T	T	C	G	G	A	G	C	G
A/Swine/Colombia/4(2011)	C	A	A	T	A	G	G	T	T	C	G	G	A	G	C	G

VIRUS	POSICIÓN EN LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL GEN HA (1701pb LONGITUD TOTAL)															
	852	921	960	1056	1071	1084	1098	1164	1171	1267	1296	1386	1403	1467	1506	1665
A/Swine/Colombia/0201(2009)	T	C	T	T	A	G	C	C	G	A	T	A	G	T	C	C
A/Swine/Colombia/0301(2009)	T	C	T	T	A	G	C	C	G	A	T	A	G	T	C	C
A/Swine/Colombia/1002(2009)	T	C	T	T	A	G	C	C	G	A	T	A	G	T	C	C
A/Swine/Colombia/1101(2009)	T	C	T	T	A	G	C	C	G	A	T	A	G	T	C	C
A/Swine/Colombia/1503(2010)	T	A	T	T	A	G	C	C	G	A	C	A	G	T	A	T
A/Swine/Colombia/1(2011)	C	C	C	T	G	G	C	C	A	A	C	A	G	T	C	C
A/Swine/Colombia/2(2011)	C	C	T	T	G	G	T	C	A	A	C	A	G	T	C	C
A/Swine/Colombia/3(2011)	T	C	T	C	G	A	C	T	A	A	C	G	A	T	C	C
A/Swine/Colombia/4(2011)	T	C	T	C	G	A	C	T	A	G	C	G	A	C	C	C

Se encontró una variación en el 2,9% de la longitud de las secuencias del gen HA de los 9 virus subtipo H1N1 pandemica, correspondientes a cambios de nucleótidos por transición o transversión en 50 de las posiciones de los marcos abiertos de lectura evaluados. Los cambios atribuidos a transiciones (A-G o T-C), fueron el 78% de las

variaciones encontradas, correspondientes a 39 de los 50 cambios en los nucleótidos de las secuencias, de las cuales 53, 8% fueron transiciones entre A-G/G-A (21 cambios) y 46,2 % fueron transiciones entre T-C/C-T (18 cambios). Asi mismo los cambios atribuidos a transversiones fueron del 22% correspondientes a 11 cambios de los 50 encontrados dividos en 27,3% transversión A-T/T-A (3 cambios), 45,5% transversión A-C/C-S (5 cambios), 18,2% transversión G-T/T-G (2 cambios) y 9% transversión C-G/G-C (1 cambio).

Tabla 7-2: Variaciones en el gen NA entre los virus de influenza Porcina H1N1 pandémicos Colombianos

VIRUS	POSICIÓN EN LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL GEN NA (1410pb LONGITUD TOTAL)																						
	135	169	167	219	235	253	284	376	384	417	486	720	721	792	905	984	987	987	1082	1106	1107	1131	1248
A/Swine/Colombia/0201(2009)	G	G	A	C	T	T	G	C	A	G	T	T	G	C	C	T	T	T	C	A	C	G	T
A/Swine/Colombia/0301(2009)	G	G	A	C	T	T	G	C	A	G	T	T	G	C	C	T	T	T	C	A	C	G	T
A/Swine/Colombia/1002(2009)	G	G	A	T	T	T	G	C	A	G	T	T	G	C	C	T	T	T	C	A	C	G	T
A/Swine/Colombia/1101(2009)	G	G	A	C	T	T	G	C	A	G	T	T	G	C	C	T	T	T	C	A	C	G	T
A/Swine/Colombia/1503(2010)	G	G	A	C	T	A	A	C	G	A	T	T	G	T	C	C	T	T	T	G	C	G	T
A/Swine/Colombia/1(2011)	A	G	A	C	T	T	G	C	A	G	T	C	A	C	C	T	T	T	C	A	A	A	Y
A/Swine/Colombia/2(2011)	A	S	R	C	T	T	G	C	A	G	T	C	A	C	C	T	T	T	C	A	A	A	Y
A/Swine/Colombia/3(2011)	R	G	A	C	W	T	G	Y	A	G	T	C	A	C	C	T	T	T	C	A	A	A	Y
A/Swine/Colombia/4(2011)	R	G	A	C	W	T	G	Y	A	G	Y	C	A	C	S	T	W	W	C	A	A	A	Y

En el análisis de las secuencias del gen HA de los 9 virus subtipo H1N1 pandemica se encontró una variación en el 1,14% de la longitud correspondientes a cambios de nucleótidos por transición o transversión en 16 de las posiciones de los marcos abiertos de lectura evaluados. Los cambios atribuidos a transiciones (A-G o T-C), fueron el 87,5% de las variaciones encontradas, correspondientes a 14 de los 16 cambios en los nucleótidos de las secuencias, de las cuales 57,1% fueron transiciones entre A-G/G-A (8 cambios) y 42,9% fueron transiciones entre T-C/C-T (6 cambios). Los cambios atribuidos a transversiones fueron del 12,5% correspondientes a 2 cambios de los 16 encontrados, dividos en 50% transversión A-T/T-A (1 cambios) y 50% transversión A-C/C-A (1 cambios).

Tabla 7-3: Cambios en la secuencia de Aminoácidos en la secuencia de HA de los virus de influenza porcina H1N1 pandémicos Colombianos

VIRUS	PROTEÍNA HA (566 AA DE LONGITUD)																				
	15	60	78	91	96	99	114	130	144	146	159	190	200	202	203	240	362	391	423	468	562
A/Swine/Colombia/0201(2009)	T	K	I	S	I	T	D	R	D	N	K	I	S	S	A	R	V	E	N	S	D
A/Swine/Colombia/0301(2009)	T	K	I	S	I	T	D	R	D	N	K	I	S	S	A	R	V	E	N	S	D
A/Swine/Colombia/1002(2009)	A	K	I	S	I	T	D	R	D	N	K	I	P	S	A	Q	V	E	N	S	D
A/Swine/Colombia/1101(2009)	T	K	I	S	I	T	D	R	E	N	K	I	S	S	A	Q	V	E	N	S	D
A/Swine/Colombia/1503(2010)	A	K	I	S	M	S	D	K	D	N	R	V	S	S	A	Q	V	E	N	S	E
A/Swine/Colombia/1(2011)	A	R	I	R	I	T	N	R	D	S	K	V	S	S	T	Q	V	K	N	S	D
A/Swine/Colombia/2(2011)	A	R	I	R	I	T	N	R	D	S	K	V	S	S	T	Q	V	K	N	S	D
A/Swine/Colombia/3(2011)	A	K	T	S	I	T	N	R	D	N	K	V	S	T	A	Q	I	K	N	N	D
A/Swine/Colombia/4(2011)	A	K	I	S	I	T	N	R	D	N	K	V	S	T	A	Q	I	K	D	N	D

Bibliografía

Achenbach. J y Bowen. R. The effect of oseltamivir carboxylate consumption on the emergence of drug resistant H5N2 avian influenza virus in mallard ducks. Antimicrob. Agents Chemother. 2013 doi:10.1128/AAC.02126-12

Acosta, O., Guerrero, C.A., Cortés, J.A. Aspectos Básicos, Clínicos y Epidemiológicos de la Influenza. Rev.Fac.Med. 2009; 57 (2)

Air. G, Laver. W. The neuraminidase of influenza virus. Proteins. 1990; 6 (4): 341-56.

Alexander, D., and Brown, I. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. Rev. Sci. Tech. 2000; 19(1): 197–225.

Arias, C., Escalera-Zamudio, M., Soto-Del Rıo, M., Cobian-Guemes, A., Isa, P., and Lopez, S. Molecular Anatomy of 2009 Influenza Virus A (H1N1) Review Article . Archives of Medical Research. 2009; 40(8): 643-654

Asociación Colombiana de Porcicultores. Colombia en alerta por Influenza A (H1N1): la industria porcícola más afectada. Porcicultura Colombiana. No. 128 (Abril 2009). Bogotá. Pág, 10-11, ISSN 0122-4220. Editorial Scripto. Edición 128, Bogotá. 2009a

Asociación Colombiana de Porcicultores FONDO nacional de la porcicultura informe de coyuntura del sector porcícola Colombiano 2009. http://asoporcicultores.co/porcicultores/images/porcicultores/informes/2009/Informe%20Economico%20Anual%20de%202009.pdf 2009b.

Barrero, P, Viegas. M, Valinotto. L, Mistchenko. A, Genetic and phylogenetic analysis of influenza A H1N1pdm virus in Buenos Aires, Argentina. J. Virol. 2011, 85: 1058–1066.

Belshe, R. The Origins of Pandemic Influenza — Lessons from the 1918 Virus. New England Journal of Medicine. 2005; 353: 2209-2211.

Bhatt S, Lam TT, Lycett SJ, Leigh Brown AJ, Bowden TA, Holmes EC, Guan Y, Wood JLN, Brown IH, Kellam P, Combating Swine Influenza Consortium, Pybus OG. The

evolutionary dynamics of influenza A virus adaptation to mammalian hosts. Phil Trans R Soc B. 2013; 368: 20120382. http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0382.

Blackburne. B, Hay. A, Goldstein. R. Changing selective pressure during antigenic changes in human influenza H3. Plos Pathog. 2008; 4: e1000058.

Boulanger, A., Ramírez, O.J., Moscardi, A., editors. Serological evidence of swine influenza virus infection on Venezuela pigs farms. 18th International Pig Veterinary Society Congress; 2004; Hamburgo, Alemania: International Pig Veterinary Society. 2004.

Bouvier, NM., Palese, P. The biology of influenza viruses. Vaccine. 2008: 26(Suppl 4), D49-D53.

Brown, E. Influenza virus genetics. Biomed & Pharmacother. 2000; 54: 196-209

Brown, I, Harris, P, McCauley, J, Alexander, D. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. J Gen Virol. 1998; 79, 2947–2955.

Bush RM, Fitch WM, Bender CA, Cox NJ. Positive selection on the H3 hemagglutinin gene of human influenza virus A. Mol Biol Evol . 1999; 16: 1457–1465.

Campitelli L, Donatelli I, Foni E, Castrucci MR, Fabiani C, Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Continued evolution of H1N1 and H3N2 influenza viruses in pigs in Italy. Virology. 1997; 232: 310 – 318. (doi:10.1006/viro.1997.8514)

Carrera. V, Mercado. M, Trujillo. M, Mendoza. S, Haspra. P, Paulin. L, Arias. C, Sánchez. J. Cambios genéticos en los genes internos del virus de influenza porcina aislado en México.Veterinaria México OA. 2014; 1 (1). http://www.revistas.unam.mx/index.php/VeterinariaMexico/article/view/43961/45413#Escalera

Carter. R y Sanford. J. . A new look at an old virus: patterns of mutation accumulation in the human H1N1 influenza virus since 1918. Theoretical Biology and Medical Modelling. 2012, 9:42

CDC. Morbidity and Mortality Weekly Report Dispatch. U.S. Centers for Disease Control. http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ mm58d0421a1.htm. [Last cited on 2009 Apr 21].

Chakrabarti AK1, Pasricha G. An insight into the PB1F2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses. Virology. 2013, 440(2):97-104. doi: 10.1016/j.virol.2013.02.025.

Chang, L.Y., Shih, S.R., Shao, P.L., Huang, D.T., & Huang, L.M. Novel swine-origin influenza virus A (H1N1): the first pandemic of the 21st century. Journal of the Formosan Medical Association; 2009; 108:526-32 .

Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R., & , Yewdell, J.W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. Nature Medicine. 2001; 7:1306–1312.

Chen, R., & Holmes, E. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. Mol Biol Evol. 2006; 23(12): 2336-41.

Chen, J.R., Ma, C., & Wong, C.H.. Vaccine design of hemagglutinin glycoprotein against influenza. Trends in biotechnology. 2011; 29: 426-434.

Chen, J. et al. A soluble domain of the membrane-anchoring chain of influenza virus hemagglutinin (HA2) folds in Escherichia coli into the low-pH-induced conformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92, 12205–12209.

Chiapponi. C, Baioni. L, Luppi. A, Moreno. A, Castellan. A, Foni. E. Temporal insight into the natural generation of a new reassortant porcine influenza virus in a swine holding Vet. Microbiol. 2014, http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.026

Chun, J. et al. Universal antibodies and their applications to the quantitative determination of virtually all subtypes of the influenza A viral hemagglutinins. Vaccine 2008:26, 6068–6076.

Cheung, T. & Poon, L. Biology of Influenza A Virus. Annals of the New York Academy of Sciences. 2007; 1102: 1–25. doi: 10.1196/annals.1408.001

Colman P.M. NA enzyme and antigen. // In The influenza viruses (R. M. Krug, ed.). Plenum Publishing Corporation, New York: 1989; 175-218.

Colman P.M., Hoyne P.A., Lawrence M.C. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. J. Virol. 1993; 67: 2972-2980.

Comas, V, Moratorioa. G, Sonoraa. M, Goñic. N, Pereyrad. S, Ifrand. S, Morenoa. P, Cristinaa. J. Phylogenetic analysis of the neuraminidase gene of pandemic H1N1 influenza A virus circulating in the South American region. Virus Res. (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.008

Combadière, B., Sibèril, S., Duffy, D.,. Keeping the memory of influenza viruses. Pathologie Biologie 2010; 58; 79–86

Cucaita, A. Estudio comparativo de la técnica de inhibición de la hemaglutinación (HI) y la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos frente al virus de la influenza porcina. (Tesis de Maestría Ciencias Biológicas). Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 2005.

Dauber, B., Heins, G., Wolff, T. the influenza B virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and anthagonizes beta interferon induction. J Clin Virol. 2004; 78: 1865-72

Das. K, Aramini. J, Ma. J, Krug. R, Arnold. E. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. Nature Structural & Molecular Biology. 2010; 17. 530–538. doi:10.1038/nsmb.1779

Das. S, Hensley. S, David. A, Schmidt. L, Gibbs. S, Puigbò. P, Ince. W, Bennink. J, Yewdell. J . Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as an immune evasion strategy Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108(51): E1417–E1422.

Dawood,F.S., Jain,S., Finelli,L., Shaw,M.W., Lindstrom,S., Garten,R.J., Gubareva,L.V., Xu,X., Bridges,C.B. and Uyeki,T.M. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. N. Engl. J. Med. 2009; 360 (25), 2605-2615

De visser. J, Elena. S. the evolution of sex: empirical insights into the roles of epistasis and drift. Nat Rev Genet. 2007; 8: 139-149.

De Vries. R, De Vries. E, Moore. K, Rigter. A, Rottier. P, De Haan. C. Only two residues are responsible for the dramatic difference in receptor binding between swine and new pandemic H1 hemagglutinin. Biol. Chem. published online. 2010 doi: 10.1074/jbc.M110.193557

De Vries. R, De Vries. E, Martínez-Romero. C, McBride. R, Van Kuppeveld. F, Rottier. P, García-Sastre. A. Paulson. J. De Haan. C. Evolution of the Hemagglutinin Protein of the New Pandemic H1N1 Influenza Virus: Maintaining Optimal Receptor Binding by Compensatory Substitutions. Journal of Virology. 2013; 87 (24): 13868–13877.

Detmer SE, Patnayak DP, Jiang Y, Gramer MR, Goyal SM. Detection of Influenza A virus in porcine oral fluid samples. J Vet Diagn Invest. 2011;23:241–247

Donovan TS. Influenza isolate selection methodology for timely autogenous vaccine use, in Proceedings. Amer Assoc Swine Vet Conf 2008;557-561.

Drake, J. W. & Holland, J. J. Mutation rates among RNA viruses. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999; 96: 13910–13913.

Dunham, E., Dugan, V., Kaser, E., Perkins, S., Brown, I., Holmes, EV., Taubenberger, J. Different Evolutionary Trajectories of European Avian-Like and Classical Swine H1N1 Influenza A Viruses. Journal of Virology. 2009; 83 (11): 5485–5494

Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., and Allan, GM. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. Vet. Microbiol. 2004; 98(2): 159–163.

Elton. D, Medcalf. L, Bishop. K, Harrison. D, Digard. P. identification of aminoacid residues of influenza virus nucleoprotein esencial for RNA binding. J Virol. 1999; 73: 7357-67.

Escalera, Z.M.; Cobian-Guemes, G, Soto del Rio, M, Isa, P, Sanchez, B.I, Parissi, C.A, Martinez, C.M, Romero, P, Velazquez, S.L, Huerta, L.B, Nelson, M, Montero H, Vinuesa, P, Lopez, S, and Arias, C. Characterization of an influenza A virus in Mexican swine that is related to the A/H1N1/2009 pandemic clade. Virology. 2012; 433, 176–182.

Estrada, R. Latin America what is the prevalence and economical effect of respiratory disease?. Pig Prog; 1988; 14:6-8.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 1985; 39:783-791.

Ferguson NM, Galvani AP, Bush RM: Ecological and immunological determinants of influenza evolution. Nature. 2003, 422:428–433

Fitch WM, Leiter JM, Li XQ, Palese P. Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88: 4270–4274.

Fitch WM, Bush RM, Bender CA, Cox NJ. Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94:7712–7718.

Flint, S.J. Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis and control of animal viruses. 2nd ed. Washington, USA. 2004 .p. 918.

Fouchier, RA., Osterhaus, AD., Brown, IH. Animal influenza virus surveillance. Vaccine. 2003; 21: 1754–1757

Fouchier, RA., Munster, V., Wallensten,S., Bestebroer, T., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G., Olsen, B., and Osterhaus, A. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from blackheaded gulls. J. Virol. 2005; 79, 2814–2822.

Freymuth F, Vabret A, Petitjean J, Gouarin S, Gueudin M, Campet M. Diagnostic de deux principales viroses respiratoires épidémiques: la gripe et les virus respiratoire syncytial. Place de la virologie moleculaire. Med Mal Infect 2000; 30: 191-200.

Furuse Y, Shimabukuro K, Odagiri T, Sawayama R, Okada T, et al. Comparison of selection pressures on the HA gene of pandemic (2009) and seasonal human and swine influenza A H1 subtype viruses. Virology. 2010; 10.1016.

Gangurde, H., Gulecha, V., Borkar, V., Mahajan, M., Khandare, R., Mundada, A. Swine Influenza A (H1N1 Virus): A Pandemic Disease. Systematic Reviews in Pharmacy. 2011; 2(2), 110-124

Garten, R., Davis, C., Russell, C., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W., Xu, X., eT al. Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. Science. 2009: 325, 197-201

Gerhard, W., Yewdell, J., Frankel, M.E. & Webster, R.G. Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies. Nature. 1981; 290, 713–717.

Gilchrist MJ, Greko C, Wallinga DB, Beran GW, Riley DG, Thorne PS. The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. Environ Health Perspect . 2007;115:313-6.

Ginocchio. C, McAdam. A. Current Best Practices for Respiratory Virus Testing. J Clin Microbiol. 2011; 49(9 Suppl): S44–S48. doi: 10.1128/JCM.00698-11

Ginting. T, Shinya. K, Kyan. Y, Makino. A, Matsumoto. N, Kaneda. S. Kawaoka. Y, Amino Acid Changes in Hemagglutinin Contribute to the Replication of Oseltamivir-Resistant H1N1 Influenza Viruses. Journal of Virology. 2012; 86 (1): 121–127.

Girard, M., Tam, J., Assossou, O., Kieny, M. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. Vaccine. 2010; 28, 4895–4902

Goh, G.K., Dunker, A.K., et al., Protein intrinsic disorder and influenza virulence. The 1918 H1N1 and H5N1 viruses. Virology Journal 2009.6, 69.

Gorman OT, Donis RO, Kawaoka Y, Webster RG: Evolution of influenza A virus PB2 genes: implications for evolution of the ribonucleoprotein complex and origin of human influenza A virus. J Virol. 1990; 64(10):4893–4902.

Graham M, Liang B, Van Domselaar G, Bastien N, Beaudoin C, et al. Nationwide Molecular Surveillance of Pandemic H1N1 Influenza A Virus. Genomes: Canada, 2009. PLoS ONE. 2011; 6(1): e16087. doi:10.1371/journal.pone.0016087

Han. L, Lu. W, Han. Y, Li. S, Yin. J, Xie. J, Su. T, Cao. G. Evolutionary characteristics of swine-origin H1N1 influenza virus that infected humans from sporadic to pandemic. Journal of Public Health and Epidemiology. 2011; 3(6): 254-270.

Hanada, K., Suzuki, Y. & Gojobori, T. A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to diversity of viral infection and transmission modes. Mol. Biol. Evol. 2004; 21: 1074–1080.

Hagen, M., Chung, T.D.Y., Butcher, A. & Krystal, M. Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5′ and 3′ viral ends for endonuclease activity. J. Virol. 1994; 68: 1509–1515.

Hanssen, H., Hincapié, O., & López, J. Influenza en porcinos de Antioquia, Colombia. O.P.S. 1977; 82, 35-43.

Harder, T.C., Grosse Beilage, E., Lange, E., Meiners, C., Dohring, S., Pesch, S., Noe, T., Grund, C., Beer, M., Starick, E., Expanded cocirculation of stable subtypes, emerging lineages, and new sporadic reassortants of porcine influenza viruses in swine populations in Northwest Germany. J. Virol. 2013; 87: 10460–10476

Hay, A. The virus genome and this replication, chapter 4. In: Nicholson K, Webster RG, Hay A. Textbook of influenza. Blackwell science. 1998.

He. L, Wu. Q, Duan. Z, Xu. H, Liu. J, , Cui. Z, Gu. M, Wang. X, Liu. X, Liu. X Two amino acid substitutions in the haemagglutinin of the 2009 pandemic H1N1 virus decrease direct-contact transmission in guinea pigs. J Gen Virol. 2014; 95 (Pt 12): 2612-2617

Heinen P. Swine influenza: a zoonosis. Vet Sci Tom 2003:1–11.

Hensley, S., Das, S., Gibbs, J., Bailey, A., Schimidt, L., Bennink, J., Ywedell, J. Influenza A virus hemagglutinin antibody escapes promotes neuraminidase antigenic variation and drug resistance. Plos One. 2011; 6 e 15190

Hill, M.A., Schidt, A.B., Tecalw, F.R., Clark, L.K., Knox, E.K., & , Jordan, M., 1992. Association between growth indicators and volume of lesions in lungs from pigs at slaughter. American Journal of Veterinary. Research; 53:2221-2223.

Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R., and Perez, D. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Archives of Virology, 2001; 146, 2275-2289.

Holmes, E., Ghedin, E., Miller, N., Taylor, J., Bao, Y., George, K., Grenfell, B., Salzberg, S., Fraser, C., Lipman, ., and Taubenberger, J. Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. PLoS Biol. 2005; 3, e300.

Hsieh YC, Wu TZ, Liu DP, Shao PL, Chang LY, Lu CY, et al. Influenza pandemics: past, present and future. J Formos Med Assoc 2006;105:1-6.

Imai, M., Watanabe, S., Odagiri, T. Influenza B virus NS2, a nuclear export protein, directly, associates with the viral ribonucleoprotein complex. Arch Virol. 2003; 148 (10): 1873-84

Jagger,B.W., Wise, H.M., Kash, J.C., Walters, K.A., Wills, N.M., Xiao, Y-L., Dunfee, R.L., Schwartzman, L.M., Ozinsky, A., Bell, G.L., Dalton, R.M., Lo, A., Efstathiou, S., Atkins, J.F., Firth, A.E., Taubenberger, J.K., Digard. P. An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response. Science. 2012; 337:199-204.

Jaime, J., Mancipe, L., Díaz, C. Actualización sobre la influenza porcina en Colombia. Rev Porcicultura Iberoam. 2011; 2:1-12

Jenkins, G. M., Rambaut, A., Pybus, O. G. & Holmes, E. C. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic approach. J. Mol. Evol. 2002; 54: 156–165. Ç

Jou WM, Verhoeyen M, Devos R, Saman E, Fang R, Huylebroeck D, Fiers W, Threlfall G, Barber C, Carey N, Emtage S. Complete structure of the hemagglutinin gene from the human influenza A/Victoria/3/75 (H3N2) strain as determined from cloned DNA. Cell. 1980 Mar;19(3):683-96.

Kaminski. M, Ohnemus. A, Staeheli. P, Rubbenstroth. D. Pandemic 2009 H1N1 influenza A virus carrying a Q136K mutation in the neuraminidase gene is resistant to zanamivir but exhibits reduced fitness in the guinea pig transmission model. J. Virol. 2012. doi:10.1128/JVI.02507-12

Kanegae Y, Sugita S, Shortridge KF, Yoshioka Y, Nerome K. Origin and evolutionary pathways of the H1 hemagglutinin gene of avian, swine and human influenza viruses: cocirculation of two distinct lineages of swine virus. Arch. Virol. 1994, 134.

Karasin, A., Brown, I., Carman, S., Olsen, C. Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. J Virol. 2000; 74, 9322-9327.

Karasin, A., West, K., Carman, S., Olsen, C. Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada. J Clin Microbiol. 2004; 42, 4349-4354.

Karlsson. E, Ciuoderis. K, Freiden. P, Seufzer. B, Jones. G, Johnson. J, Parra. R, Gongora. A, Cardenas. D, Barajas. D, Osorio. J, Schultz-Cherry. S. Prevalence and characterization of influenza viruses in diverse species in Los Llanos, Colombia. Emerging Microbes and Infections. 2013, 2, e20; doi:10.1038/emi.2013.20

Kawaoka. Y, Krauss.s, Webster. R. Avian to human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. J virol. 1989., 63 (11): 4603-8

Kawaoka, I. The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses. Curr Opin Virol. 2012; doi:10.1016/ j.coviro.2012.03.003.

Kay RM, Done SH, Paton DJ. Effect of sequential porcine reproductive and respiratory syndrome and swine influenza on the growth and performance of finishing pigs. Vet Rec 1994;135:199-204.

Khan. S, Atanasova. K, Krueger. W, Ramirez. A, Gray. G. Epidemiology, geographical distribution, and economic consequences of swine zoonoses: a narrative review. Emerging Microbes and Infections 2013; 2, e92; doi:10.1038/emi.2013.87

Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. Emerg Infect Dis 2006;12:9-14.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution. 1980; 16:111-120.

Kitikoon P, Vincent A, Jones K, Nilubol D, Yu S, Janke B, Thacker B, Thacker E. Vaccine efficacy and immune response to swine influenza virus challenge in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the time of SIV vaccination. Vet Microbiol 200;139 (3-4); 235–244

Kong,W.L., Huang,Y.M., Cao,N., Qi,H.T., Huang,L.Z., Zhao,M.M.,Guan,S.S., Wang,W.H., Zhao,F.R., Qi,W.B., Jiao,P.R. and Zhang,G.H. Isolation and Phylogenetic Analysis of H1N1 Swine Influenza Virus from Sick Pigs in Southern China. Indian J Virol. 2011; 22 (1): 66-71

Krystal, M., Elliott, R.M., Benz, E.W., Young, J.F., Palese, P., Evolution of influenza A and B viruses: Conservation of structural features in the hemagglutinin genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.; 1982.79:4800–4804.

Lamb, R.A., & , Krug, R.M., Orthomyxoviruses: the viruses and their replication, 4 ed. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1996.

Lamb, R.A., &, Choppin, P.W. The gene structure and replication of influenza virus. Annual Review of Biochemistry. 1983; 52: 467–506.

Larsen, D., Karasin, A., &, Olsen, C. Immunization of pigs against influenza virus infection by DNA vaccine priming followed by killed-virus vaccine boosting. Vaccine. 2001; 19, 2842–2853.

Laver. W, Air. G, Webster. R, Markoff. L. amino acid sequence changes in antigenic variants of type A influenza virus N2 neuraminidase. Virology. 1982. 122: 450-460

Lekcharoensuk, P., Lager, K., Vemulapalli, R., Woodruff, M.,Vincent, A., and Richt, J. Novel swine influenza virus subtype H3N1, United States. Emerging Infect. Dis. 2006; 12,787–794.

Leland. D, Ginocchio. C. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. Clin Microbiol Rev. Jan 2007; 20(1): 49–78. doi: 10.1128/CMR.00002-06

Li S., Schulman J., Itamura S., Palese P. Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus. // J. Virol. 1993; 67: 6667-6673.

Li. W, Shi. W, Qiao. H, Ho. S, Luo. A, Zhang. Y, Zhu. C. Positive selection on hemagglutinin and neuraminidase genes of H1N1 influenza viruses. Virology Journal 2011, 8:183

Lipatov, A., et al. Influenza: emergence and control. Journal of Virology. 2004; 78, 8951–8959.

Ma, W., Gramer, M., Rossow, K., and Yoon, K. Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the midwestern United States. J. Virol. 2006; 80, 5092–5096.

Ma, W., Vincent, A., Gramer, M., et al. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States.PNAS. 2007; 104, 20949-20954.

Ma, W., Lager, K., Vincent, A., Janke, B., Gramer, M., and Richt, J. The Role of Swine in the Generation of Novel Influenza Viruses REVIEW ARTICLE. Zoonoses Public Health. 2009; 56: 326–337

Ma, W., Kahn, R., and Richt, J. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. J Mol Genet Med. 2009a; 3(1), 158-166

Mahy. B. Mutants of influenza virus. In Palase P, Kingsbury D. Genetics of influenza viruses. Springer Verlag. 1983, 192-253.

Maines, T. R., Jayaraman, A., Belser, J. A., Wadford, D. A., Pappas, C., Zeng, H., Gustin, K. M., Pearce, M. B., Viswanathan, K., Shriver, Z. H., Raman, R., Cox, N. J., Sasisekharan, R., Katz, J. M., and Tumpey, T. M. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. Science. 2009; 325, 484-487

Maldonado J, Van Reeth K, Riera P, Sitjà M, Saubi N, Espuña E, Artigas C. Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. Vet J. 2006; 172(2):377-81.

Mancipe. L. Desarrollo de un Biológico contra Influenza Porcina y Evaluación en un modelo in vivo de su respuesta inmune para uso potencial en cerdos. Tesis de maestria. Grupo de Investigación: Microbiología y Epidemiología Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Posgrado en Salud Animal, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. 2012

Mandel ID, Wotman S. The salivary secretions in health and disease. Oral Sci Rev. 1976;8:25–47.

Matrosovich, M., Matrosovich, T., Gray, T., Roberts, N., Klenk, HD. Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. J. Virol. 2004; 78 (22): 12665-12667. doi: 10.1128/JVI.78.22.12665-12667.

McHardy. A, Adams. B. the role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. Plos Path. 2009; 5:e1000566.

Memoli. M, Jagger. B, Dugan. V, Jadon. L, Taubenberger. K. Recent human influenza A/H3N2 virus evolution driven by novel selection factors in addition to antigenic drift. Infect Dis. 2009; 15; 200 (8): 1232-1241.

Mould, J., Li, H.,Dudlak, C., Lear, j., Pekoz, A., Lamb, R., Pinto, L. Mechanism for proton conduction of the M2 ion channel of influenza a virus. J Biol Chem. 2000, 275: 8592-9

Mogollón, J., Rincón, M., Preciado, P., Cepeda, M., & Ruiz, S. Reactividad serológica frente al virus de la influenza porcina en explotaciones intensivas de Colombia. En: Referencias para Consultorios MV (Bogotá). 2003; 06, 15-20.

Morens, D., Taubenberger, J.H., & Fauci, A.S. The Persistent Legacy of the 1918 Influenza Virus. The New England Journal of Medicine; 2009. 361(3):225-229.

Moscoso, C., & Neira, G. Prevalencia de reactores al virus de influenza porcina H3N2 en granjas de explotación intensiva en el país. (Tesis de Pregrado). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. 2001.

Moreno, A., Di Trani, L., Faccini, S., Vaccari, G., Nigrelli, D., Boniotti, M.B., Falcone, E., Boni, A., Chiapponi, Ch., Sozzi, E. and Cordioli, P. Novel H1N2 swine in- fluenza reassortant strain in pigs derived from the pan-demic H1N1/2009 virus. Veterinary Microbiology. 2011; 149, 472-477. doi:10.1016/j.vetmic.2010.12.011

Naffakh N., Van der Wef S. April 2009: an outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus with evidence for human to human transmission. Microbes and Infection. 2009.11; 725-728.

Nakamura, R.M., Easterday, B.C., Pawlisch, R., & Walker, G.L., Swine influenza: epizootiological and serological Studies. Bull. Org. mond. Sante. and Wld Hlth Org. 1972.47, 481-487.

Nakharuthai, C., Boonsoongnern, A., Poolperm, P., Wajjwalku, W., Urairong, K., Chumsing, W., Lertwitcharasarakul, P., & Lekcharoensuk, P.,. Occurrence of swine influenza virus infection in swine with porcine respiratory disease complex. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health; 2008; 39:1045-1053.

Nam. J, Kim. E, Song. D, Choi. J, Kim. J, Poo. H. Emergence of Mammalian Species-Infectious and -Pathogenic Avian Influenza H6N5 Virus with No Evidence of Adaptation. J Virol. 2011; 85(24): 13271–13277. doi: 10.1128/JVI.05038-11

Nava G. M., M. S. Attene-Ramos, J. K. Ang & M. Escorcia. Origins of the new Influeza A(H1N1) virus: time to take action. Eurosurveillance. 2009;14(22):1-22.

Nayak, D., Balogun, R. Yamada, H., Hong Zhou, Z., Barman, S. Influenza virus morphogenesis and budding. Virus Research. 2009;143; 147-161

Nelson, M., & Holmes, E. The evolution of epidemic influenza. Nat Rev Genet. 2007; 8, 196-205.

Nelson. M, Simonsen. L, Viboud. C, Miller. M, Taylor. J, st Gerorge k, Griesemer. S, Ghedi. E, Sengamalay. N, Spiro. D, Grenfell. B, Lipman. D, Taubenberger. J, Holmes. E. Stochastic processes are key determinants of short-term evolution in influenza A virus. Plos Pathog. 2006; 2 (12): e125.

Neumann G, Noda T, Kawaoka Y . Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature. 2009; 459: 931-939.

Neumann. G, Macken. C, Kawaoka. Y. identification of Amino Acid Changes That May Have Been Critical for the Genesis of A(H7N9) Influenza Viruses. J. Virol. May 2014 vol. 88 no. 94877-4896.

Nicholson, K.G., Wood, J.M., Zambon, M. 2003. Influenza. Lancet. 22 (362); 1733-1745 OMS, 2005. Who animal influenza manual. Diagnosis and Surveillance WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 –

Oh. D, Hurt. A. A Review of the Antiviral Susceptibility of Human and Avian Influenza Viruses over the Last Decade. Scientifica. 2014, Article ID 430629, 10 pages. http://dx.doi.org/10.1155/2014/430629

Olsen, C.W., Brown, I.H., Easterday, B.C., Van Reeth, K., Swine influenza. In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., Taylor, D.J., D'Allaire, S. (Eds.), Diseases of Swine. University Press, Ames, IA, 2006.pp. 469–482.

Olsen, C.The emergence of novel swine influenza viruses in North America. Virus Res. 2002; 85, 199–210.

Palese, P., Shaw, M. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, eds. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins; 2006; 1647-1689.

Parmar, S., Shah, N., Kasarwala, M., Virpura, M., & Prajapati, D. A Review on Swine Flu. JPSBR; 2011.1(1):11-17.

Peiris J. S. M., L. L. M. Poon & Y. Guan. Emergence of a novel swine-origin Influeza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. Journal of Clinical Virology. 2009;. 45:169–173.

Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachmann PA. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. Bull. World Health Organ. 1981; 59, 75.

Perales, B., Sanz-Ezquerro, J., Gastaminza, P., Ortega, J., Fernandez, J., Ortin, J., Nieto, A. the replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. J Virol. 2000; 74: 1307-12

Pekosz. A, Newby. C, Bose. P, Lutz. A. Sialic acid recognition is a key determinant of influenza A virus tropism in murine trachea epithelial cell cultures. Virology. 2009; 386 (1): 61–67

Pereda, A., Rimondi, A., Cappuccio, J., Sanguinetti, R., Angel, M., Ye, J., et al. Evidence of reassortment of pandemic H1N1 influenza virus in swine in Argentina: are we facing the expansion of potential epicenters of influenza emergence?. Influenza and Other Respiratory Viruses, 2011; 5, 409–412. DOI:10.1111/j.1750-2659.2011.00246.x

Pineyro, P., Baumeister, E., Cappuccio, J., Machuca, M., Quiroga, M., Tedoroff, T., et al. Prevalencia serologica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante la temporada 2002: evaluacion mediante inhibicion de la hemaglutinacion y ELISA. Rev Argent Microbiol.2010; 42(2), 98-101.

Pizzorno. A, Bouhy. X, Abed. Y, Boivin. G. Generation and Characterization of Recombinant Pandemic Influenza A(H1N1) Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors. The Journal of Infectious Diseases 2011;203:25–31.

Platt, R., Vincent, A.L., Gauger, P.C., Lovingb, C.L., Zanellab, E.L., Lager, K.M., Kehrli, Jr. Kimuraa, K., Rotha, J.A., Comparison of humoral and cellular immune responses to inactivated swine influenza virus vaccine in weaned pigs. Vet. Immunol. Immunopath. 2011.142; 252– 257.

Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I. & Krug, R.M. A unique cap(m^7GpppXm)-dependent influenza virion endonucleaase cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. Cell. 1981; 23: 847–858.

Porter, A.G., Barber, C., Carey, N.H., Hallewell, R.A., Threlfall, G., & , Emtage, J.S., Complete nucleotide sequence of an influenza virus haemagglutinin gene from cloned DNA. Nature; 1979. 282:471–477.

Prickett JR, Kim W, Simer R, Yoon KJ, Zimmerman J. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. J. Swine Health Prod. 2008;16:86–91.

Ramirez-Nieto, G., Diaz Rojas, C., Vera Alfonso, J. First isolation and identification of H1N1 swine influenza viruses in Colombian pig farms. Health, 2012; 4, 983-990

Reid, A., Taubenberger, J., Fanning, T. The 1918 Spanish Influenza: integrating history and biology Microbes and Infection. 2001; 3, 81−87

Reeth, V. K., Vleeschauwer, A., Kyriakis, C., Pensaert ,M. Influenza in Birds, Pigs and Humans: Old Theories versus Current Viewpoints. Proceedings of the 19th IPVS congress, Copenhagen, Denmark. 2006. Volume 1

Rekik. M, Arora. D, Dea. S. Genetic Variation in Swine Influenza Virus A Isolate Associated with Proliferative and Necrotizing Pneumonia in Pigs. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1994, p. 515-518

Richt, J., Lager, K., Janke, B., Woods, R., Webster, R., and Webby, R. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. J. Clin. Microbiol. 2003; 41, 3198–3205.

Rogers, G.N., Paulson, J.C., et al., Single amino acid substitutions in influenzaVhaemagglutinin change receptor binding specificity. Nature 1983. 304 (5921), 76–78.

Romagosa. A, Gramer. M, Joo. H, Torremorell. M. Sensitivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. Influenza Other Respi Viruses. 2012; 6(2): 110–118. Published online Jul 21, 2011. doi: 10.1111/j.1750-2659.2011.00276.x

Ruiz, A.G. Virus de la influenza porcina y la experiencia de vacunación en Chile. Universidad de Concorpción, Faculdad de Ciencias Veterinarias. 2011.

Saitou, N., & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987; 4(4): 406-25.

Sanchez, D., Carreón, R., & Palacios, J. Comparación de dos métodos diagnósticos para la detección del virus de influenza porcina. Veterinaria México. 2010; 41, 45-58.

SanJuan. R, Cuevas. J, Moya. A, Elena. S. epistasis and the adaptability of an RNA virus. Genetics. 2005; 170: 1001-1008.

Skehel, J.J. and Wiley, D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. Annu. Rev. Biochem. 2000. 69, 531–569

Schnell, JR., Chou, JJ. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. Nature. 2008; 451(7178):591-5. doi: 10.1038/nature06531.

Scholtissek. C, Rohde. W, Von Hoyningen. V, Rott. R. on the origin of the human influenza virus subtype H2N2 and H3N2. Virology. 1978; 87: 13-20.

Scholtissek, C., Molecular evolution of influenza viruses. Virus Genes. 1995.11, 209–215.

Scholtissek, C., Quack, G., et al., How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. Antiviral Research. 1998. 37 (2), 83–95.

Shen J, Ma J, Wang Q. Evolutionary Trends of A(H1N1) Influenza Virus Hemagglutinin Since 1918. PLoS ONE 2009 4(11): e7789. doi:10.1371/

Shi. Y, Wu. Y, Zhang. W, Qi. J. Gao. G. Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. Nature Reviews Microbiology. 2014; 12: 822-831

Shin JY, Song MS, Lee EH, Lee YM, Kim SY, Kim HK, et al. Isolation and characterization of novel H3N1 swine influenza viruses from pigs with respiratory diseases in Korea. J Clin Microbiol 2006;44:3923–7.

Shope, R. E. Swine influenza: III. Filtration experiments and etiology. J. Exp. Med. 1931, 54, 373–385.

Shortridge KF, Webster RG. Geographical distribution of swine (Hsw1N1) and Hong Kong (H3N2) influenza virus variants in pigs in southeast Asia. Intervirology. 1979; 11, 9 – 15. (doi:10.1159/ 000149006)

Shtyrya. Y, Mochalova. L, Bovin. N. Influenza Virus Neuraminidase: Structure and Function. RE VIEWS. Acta naturae. 2009; 2: 26-32

Skehel, J.J. et al. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1984; 81, 1779–1783.

Smith, G.L., Hay, A.J. Replication of the influenza virus genome. Virology. 1982; 118:96–108.

Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. Nature. 2009; 459(7250): 1122–1125. 10.1038/nature08182.

Soundararajan. V, Zheng. S, Patel. N, Warnock. K, Raman. R, Wilson. I, Raguram. S, Sasisekharan. V, Sasisekharan. R. Networks link antigenic and receptor-binding sites of influenza hemagglutinin: Mechanistic insight into fitter strain propagation. Sci Rep. 2011; 1: 200 doi: 10.1038/srep00200

Spiro,D., Halpin,R., Boyne,A., Bera,J., Ghedin,E., Hostetler,J., Fedorova,N., Kim,M., Zaborsky,J., Overton,L., Djuric,K., Sarmiento,M., Sitz,J., Katzel,D., Brown,E.G., Keleta,L., Bao,Y., Sanders,R., Dernovoy,D., Kiryutin,B., Lipman,D.J. and Tatusova,T. The NIAID Influenza Genome Sequencing Project - The NIAID Influenza Genome Sequencing Consortium. behalf of JCVI/University of Ottawa/NCBI, National Center for Biotechnology Information, NIH,Bethesda, MD 20894, USA. 2009

Steinhauer, D.A., Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. Virology; 1999. 258:1–20.

Steinhauer, D., Skehel, J. Genetics of influenza viruses. Annu. Rev. Genet. 2002; 36, 305–32

Stevens, J., Blixt, O., Terrence, M., Tumpey, Taubenberger, J., Paulson, J., & , I., W., Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus. Science; 2006. 312:404-410.

Stoner. T, Krauss. S, DuBois. R, Negovetich. N, Stallknecht. D. Senne. D, Gramer. M, Swafford. S, DeLiberto. T, Govorkova. E, Webster. R. Antiviral Susceptibility of Avian and Swine Influenza Virus of the N1 Neuraminidase Subtype. Journal of Virology. 2010, p. 9800–9809

Suzuki, Y., and Nei, M. Reliabilities of parsimony-based and likelihood-based methods for detecting positive selection at single amino acid sites. Molecular Biology and Evolution; 2001.18:2179–2185.

Suzuki. Y, Nei. M. Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. Mol Biol Evol. 2002; 19 (4): 501-509

Suzuki. Y y Nei. M. Origin and Evolution of Influenza Virus Hemagglutinin Genes. Mol. Biol. Evol. 2002; 19(4):501–509

Takano, R., Nidom, C., Kiso, M., et al. A comparison of the pathogenicity of avian and swine H5N1 influenza viruses in Indonesia. Arch Virol. 2009; 154, 677-681.

Takahashi T., Suzuki T., Hidari K.I-P.J., Miyamoto D., Suzuki Y. A molecular mechanism for the low-pH stability of sialidase activity of influenza A virus N2 neuraminidases. // FEBS Lett. 2003. 543: 71-75.

Talledo. M, Zumaeta. K. Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. Rev. peru. Biol. 2009; 16(2): 227 – 238.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 2013; 30 2725-2729.

Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. Emerg Infect Dis 2006;12:15-22.

Taubenberger, J., and Kash, J. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation Cell Host & Microbe. 2010; 7, 440-451 DOI 10.1016/j.chom.2010.05.009

Teodoroff, T., Pecoraro, M., Baumeister, E., Janke, B., Machuca, M., Cappuccio, J., et al. Serological and immunohistochemical studies of influenza virus in fattening pigs in Argentina. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases; Roma, Italia. 2003; 262-3.

Thacker, E., Thacker, B., and Janke, B. Interaction between Mycoplasma hyopneumoniae and swine influenza virus. J. Clin. Microbiol. 2001; 39, 2525–2530

Thacker, E., and Janke, B. Swine Influenza Virus: Zoonotic Potential and Vaccination Strategies for the Control of Avian and Swine Influenzas. Journal of Infectious Diseases. 2008; 197, S19-S24.

Tong, S., Lia, Y., Rivailler, P., et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 13;109(11):4269-74. doi: 10.1073/pnas.1116200109.

Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. PLOS Pathogens. 2013; 9 (10) : e1003657

Topal M D, Fresco J R. Complementary base pairing and the origin of substitution mutations. Nature.1976;263:285–289.

Torremorell, M. Allerson, M. Corzo C., Dı´az A. Gramer M. Transmission of Influenza A Virus in Pigs. Transboundary. and Emerging Diseases. 2012. 59 (Suppl. 1) 68–84

Trifonov V., H. Khiabanian & R. Rabadan. Geographic Dependence, Surveillance, and Origins of the 2009 Influenza A (H1N1) Virus. The New England Journal of Medicine. 2009a. 10.1056/NEJMp0904572.

Trifonov V., H. Khiabanian, B. Greenbaum & R. Rabadan. The origin of the recent swine Influeza A(H1N1) virus infecting humans. Eurosurveillance. 2009b; 14(17):1.

Tumpey TM, Maines TR, Van Hoeven N, Glaser L, Solo´rzano A, et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. Science. 2007, 315: 655–9.

Uhlendorff. J, Matrosovich. T, Klenk. H, Matrosovich. M. Functional significance of the hemadsorption activity of influenza virus neuraminidase and its alteration in pandemic viruses. Arch. Virol. 2009; 154: 945–957

Van der Vries E, Veldhuis Kroeze EJ, Stittelaar KJ, et al. Multidrug Resistant 2009 A/H1N1 Influenza Clinical Isolate with a Neuraminidase I223R Mutation Retains Its Virulence and Transmissibility in Ferrets. Pekosz A, ed. PLoS Pathogens 2011;7(9):e1002276. doi:10.1371/journal.ppat.1002276.

Vargas. M. Influenza A H1N1 de origen porcino: Métodos diagnósticos. Revista de la Facultad de Medicina (Open Journal Systems). 2010. 58 (1): 1-10

Varghese J.N., Colman P.M. Three-dimensional structure o 1. f the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 A resolution. // J. Mol. Biol.1991. 221: 473-486.

Vijaykrishna, D., Smith, G., Pybus, O., et al. Long-term evolution and transmission dynamics of swine influenza A virus. Nature. 2011; 473, 519 -523 doi:10.1038/nature10004

Vincent, A., Lager, K., Faaberg, K., Harland, M., Zanella, E., Ciacci-Zanella, J., Kehrli, M., Janke, B., & Klimov, A. Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. Influenza Other Respi Viruses. 2010; 4, 53-60.

Vincent, A.L., Ma, W., Lager, K.M., Janke, B.H. and Ri- cht, J.A. Swine influenza viruses a North Ameri- can perspective. Advances in Virus Research. 2008; 72, 127-154. doi:10.1016/S0065-3527(08)00403-X.

Wagner R., Wolf T., Herwig A., Pleschka S., Klenk H.-D. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza growth: a study byreverse genetics. // J. Virol. 2000. 74: 6316-6323.

Wang T. T. & P. Palese. Unraveling the mistery of swine Influeza virus. Cell. 2009; 137: 983-985.

Webby, R., and Webster, R. Emergence of influenza A viruses. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2001; 356, 1817–1828.

Webby, R., Rossow, K., Erickson, G., Sims,Y., and Webster, R. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. Virus Res. 2004; 103, 67–73.

Webster, R., Bean, W., Gorman, O., et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev. 1992; 56:152-179.

Webster, R. Are equine 1 influenza viruses still present in horses? Equine Vet. J. 1993; 25, 537–538.

Wei Hu. Novel host markers in the 2009 pandemic H1N1 influenza a virus J. Biomedical Science and Engineering, 2010, 3, 584-601 doi:10.4236/jbise.2010.3608

Wei, C.J. et al. Cross-neutralization of 1918 and 2009 influenza viruses: role of glycans in viral evolution and vaccine design. Sci. Transl. Med. 2012, 24ra21

Widjaja, L., Krauss, S., Webby, R., Xie, T., Webster, R. Matrix gene of influenza A viruses isolated from wild aquatic birds: ecology and emergence of influenza A viruses. J. Virol. 2004; 78 (16), 8771. DOI: 10.1128/jvi.78.16.8771-8779.2004

Wiley, D.C. & Skehel, J.J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. Annu. Rev. Biochem. 1987. 56, 365–394.

Wilson, I.A., Skehel, J.J., & , Wiley, D.C.,. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. Nature. 1981; 289:366–373.

Wilson, I.A. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. Annu. Rev. Immunol.; 1990, 8:737-771.

Wilson, W. Equine influenza. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 1993; 9, 257–282.

Wise, H.M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R.M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E.C., Barclay, W.S., Digard, P. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. J. Virol. 2009.83, 8021–8031.

WHO World Organization for Animal Health. The OIE advocates implementing international standards for humane killing of animals for disease prevention purposes. Paris: OIE, 2012. Available at: http://www.oie.int/en/for-the-media/press-releases/detail/article/theoie-advocates-implementing-international-standards-for-humane-killing-of-animals-fordisease-pre/ consultado: diciembre 2014.

WHO. World Health Organization 2011. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. encontrado en: http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_CDS_CSR_NCS_2002.5.pdf. Consultado: enero 2014

Worobey, M., Han, G., Rambaut, A., A synchronized global sweep of the internal genes of modern avian influenza virus. Nature 2014; .508: 254–257.

Wu, W, Pante, N. The directionality of the nuclear transport of the influenza A genome is driven by selective exposure of nuclear localization sequences on nucleoprotein. Virol. J. 2009; 6,68.

Wu, Y., Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y., Gao, G.F. Bat-derived influenzalike viruses H17N10 and H18N11. Trends Microbiol. 201422, 183–191.

Yu, H., Zhang, G., Hua, R., et al. Isolation and genetic analysis of human origin H1N1 and H3N2 influenza viruses from pigs in China. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 356, 91-96.

Yuan, W., Krug, RM. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (INF) induced ubiquitin-like ISG15 protein. EMBO J. 2001; 20: 362-71

Xu. R, Zhu.X, McBride. R, Nycholat. C. Yu. W, Paulson. J, Wilson. Functional Balance of the Hemagglutinin and Neuraminidase Activities Accompanies the Emergence of the 2009 H1N1 InfluenzaPandemic. Journal of Virology 2012, 86 (17); p. 9221–9232

Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R., Palese, P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. PLoS pathogens. 2005; 1(1):4.

Zanella. INFLUENZA VIRUS INFECTION IN PIGS Virus Reviews and Research. Sociedade Brasileira de Virologia. 2014. 1-7

Zhang, W. et al. Molecular basis of the receptor binding specificity switch of the hemagglutinins from both the 1918 and 2009 pandemic influenza A viruses by a D225G substitution. J. Virol. 2013. 87: 5949–5958

Zhao. G, Fan. Q, Zhong. L, Li. Y, Liu. W, Liu. X, Gao. S, Peng. D, Liu. X. Isolation and phylogenetic analysis of pandemic H1N1/09 influenza virus from swine in Jiangsu province of China. Research in Veterinary Science. 2012, 93: 125–132.

Zhou, N., Senne, D., Landgraf, J., et al. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. J Virol 1999; 73 (10): 8851-8856